



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ELIMINACIÓN DE PENICILINAS, FLUOROQUINOLONAS Y
SULFAMIDAS Y ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBIÓTICA MEDIANTE PROCESOS ELECTROQUÍMICOS

Autora:

Andrea Dobato Amorós

Directora:

Rosa Mosteo Abad

Codirectora:

Sindy Dayana Jojoa

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2018/2019

Agradecimientos

Me gustaría agradecer este trabajo fin de grado a todas las personas que directa o indirectamente lo han hecho posible. A Dayana, por su paciencia, su dedicación, sus ganas de enseñarme todo lo que sabe y por los buenos ratos que hemos pasado. A todo el departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, en especial a Rosa Mosteo por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección. También agradecer a JIUZ-2018-TEC-08: “Estudio de degradación de antibióticos en aguas mediante tratamientos foto-catalíticos con dióxido de titanio” y al grupo de investigación “Agua y Salud Ambiental” financiado por el Gobierno de Aragón y Fondos FEDER 2014-2020 por hacer posible la financiación de este trabajo fin de grado.

Gracias también a mi familia, amigos y pareja, porque han sido partícipes de esto, cuando todo salía como esperaba y cuando no, en la realización del Trabajo Fin de Grado y durante los cuatro años de carrera, por la paciencia y el apoyo incondicional que siempre me aportan.

Resumen

El objeto principal de este estudio es evaluar la capacidad de eliminación de compuestos orgánicos refractarios presentes en aguas mediante la aplicación de procesos electroquímicos. Los compuestos objeto de estudio son sustancias con actividad antibiótica, las cuales son detectadas habitualmente en aguas residuales, y que promueven la generación de cepas multirresistentes, lo que pone en riesgo la salud pública. No obstante, todavía no se encuentran regulados según normativa de calidad de aguas, por lo que se catalogan como contaminantes emergentes.

En el presente trabajo fin de titulación, además, se considera de interés analizar el efecto que produce el tipo de antibiótico en la efectividad de dos de estos procesos electroquímicos, uno usando un ánodo dimensionalmente estable (DSA) y el segundo, la oxidación avanzada con ánodos de diamante dopado con boro (BDD).

Los antibióticos seleccionados pertenecen a las familias de betalactámicos y fluoroquinolonas, concretamente Amoxicilina, Penicilina G; Levofloxacin y Ciprofloxacina, respectivamente. Se evalúa la técnica de seguimiento más conveniente para estos compuestos a lo largo del tratamiento. Para ello, se realizarán mediciones a diferentes concentraciones mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A lo largo de este trabajo fin de titulación, se observará que el método de oxidación con ánodo de óxido de iridio es más efectivo en la eliminación de los antibióticos que la oxidación avanzada con ánodo de diamante dopado con boro, además, se determinará que la Ciprofloxacina se puede eliminar casi por completo en 60 minutos mediante oxidación electroquímica con DSA. También, mediante el parámetro actividad antibiótica, que está relacionado tanto con el compuesto inicial como con los compuestos intermedios que todavía presenten capacidad antibiótica, con la medición del Carbono Orgánico Disuelto y el seguimiento de la concentración de especies oxidantes durante los experimentos, se verificará el grado de transformación de las moléculas de partida.

Abreviaciones

BDD Diamante Dopado con Boro

DSA Dimensionally Stable Anode

HPLC High Performance Liquid Chromatography

COD Carbono Orgánico Disuelto

AA Actividad Antibiótica

ONU Organización de las Naciones Unidas

CE Contaminantes Emergentes

OMS Organización Mundial de la Salud

CI Carbono Inorgánico

CT Carbono Total

E. coli *Escherichia coli*

S. aureus *Staphylococcus aureus*

LEV Levofloxacin

CIP Ciprofloxacina

PCG Penicilina G

AMX Amoxicilina

TIL Tilosina

AZIT Azitromicina

SULF Sulfadiazina

SULFMET Sulfametoxazol

FQs Fluoroquinolonas

Prom Promedio

S Desviación estándar

A Referente al primer experimento del duplicado

B Referente al segundo experimento del duplicado

Índice

1.	Introducción	6
2.	Objetivos	9
2.1.	General	9
2.2.	Específicos.....	9
3.	Procedimiento Experimental y Metodología Analítica	10
3.1.	Descripción de la instalación	10
3.2.	Preparación de la muestra.....	11
3.3.	Ensayos de degradación de antibióticos.....	12
3.4.	Parámetros de control y respuesta.....	13
3.4.1.	Determinación concentración de Antibióticos	13
3.4.2.	Seguimiento de la Actividad Antibiótica	13
3.4.3.	Detección y cuantificación de peróxido de hidrógeno	14
3.4.4.	Detección de especies activas de cloro	14
3.4.5.	Medición de pH.....	15
3.4.6.	Determinación de Carbono Orgánico Disuelto	16
4.	Resultados y análisis	17
4.1.	Estandarización de métodos de control y respuesta.....	17
4.2.	Evaluación de procesos electroquímicos	26
4.2.1.	Oxidación electroquímica con DSA.....	26
4.2.2.	Oxidación avanzada con ánodo BDD.....	31
5.	Conclusiones.....	34
6.	Bibliografía	36

ANEXO I METODOLOGÍA ANALÍTICA DE PROCESOS FÍSICO QUÍMICOS

ANEXO II RESULTADOS

1. Introducción

El agua es un recurso abundante en la tierra. Sin embargo, es considerada por la ONU como un recurso finito y vulnerable, pues cuando se habla del agua consumible, el porcentaje de disponibilidad se reduce drásticamente (1). El agua dulce representa únicamente el 3% del total del agua en el planeta, de la cual la mayor parte son glaciares o zonas polares en estado sólido, y solo un 1% se encuentra en lagos, ríos y a poca profundidad del suelo siendo así accesible al ser humano (2). Esta situación se agrava al considerar el permanente aumento en la demanda del agua, su inadecuado uso y el escaso e ineficiente tratamiento de las aguas residuales en numerosas latitudes a nivel mundial.

En este sentido, garantizar la calidad del agua de abastecimiento, así como reducir la contaminación presente en vertidos de tipo agrícola, urbano e industrial, es de elevado interés. En los últimos años llama la atención la presencia en las aguas de productos de cuidado personal, productos farmacéuticos, drogas de abuso, retardantes de llama etc., los cuales han sido catalogados como contaminantes emergentes (CE) (3) (4). Los CE son sustancias presentes en aguas a muy bajas concentraciones (micro y nanogramos por litro), cuyos efectos son desconocidos o parcialmente desconocidos y por tanto su presencia en el medio hídrico no está actualmente regulada (5).

Entre los CE, los antibióticos generan gran preocupación debido a su alto e inadecuado consumo, pues además de ser usados en el ámbito médico y veterinario, según la OMS, su administración en la industria agropecuaria, piscicultura y alimentaria alcanza aproximadamente el 80% del total de ventas, con la finalidad, principalmente, de estimular el crecimiento en animales sanos (6), una situación peligrosa, no solo para el medio ambiente, sino también para los seres humanos, debido a la presión selectiva que ejercen sobre bacterias presentes en el agua y que las hacen multirresistentes a los tratamientos médicos usados comúnmente (7). De hecho, según un informe del Seminario sobre Ciencia y Salud

realizado en Boston, las infecciones por bacteria son la segunda causa de muertes humanas en el mundo (8).

La presencia de antibióticos y/o sus metabolitos en aguas residuales urbanas depuradas, demuestran, por tanto, que los métodos convencionales de tratamiento de aguas resultan poco eficientes para su eliminación (9) (10), mientras que otros tratamientos alternos como la adsorción en carbón activo o la nanofiltración con membranas solo cambian de fase el contaminante pero, esta última además requiere del consumo de energía debido a la presión para forzar el paso del agua (5) (9) (10). Técnicas como los procesos de electrooxidación y de oxidación electroquímica avanzada, pueden ser una alternativa a los tratamientos convencionales ya que, recientemente, han demostrado que pueden lograr la eliminación de gran variedad de compuestos orgánicos, como el ibuprofeno, ciclofenaco o carbamezapina (11), además de otras ventajas como son su simplicidad y seguridad en términos ambientales, al no requerir de la adición de reactivos adicionales (12) (9) (10).

Los procesos que utilizan electricidad para eliminar contaminantes se fundamentan en producir *in situ* agentes oxidantes. Cuando la especie producida es el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) se conocen como procesos electroquímicos de oxidación avanzada (PEOA). El $\bullet\text{OH}$ es una especie con un alto potencial estándar ($E^\circ = 2.80 \text{ V vs SHE}$) que lo hace capaz de reaccionar de forma no selectiva con compuestos orgánicos para producir derivados hidroxilados o deshidrogenados. Estos oxidantes pueden permanecer quimisorbidos en la superficie de ánodos activos como los DSA (dimensionalmente estables) o estar más disponibles por fisisorción en ánodos no activos como los hechos de Diamante dopado con Boro (BDD).

Así, la transformación electroquímica puede ocurrir a través de la reacción directa en la superficie del ánodo debido a la formación del $\bullet\text{OH}$, o indirecta como resultado de la reacción de los contaminantes con otras especies oxidantes intermediarias. Estas sustancias se forman a partir de iones del electrolito soporte

y como consecuencia de la capacidad catalítica de materiales aniónicos como los DSA o por el sobrepotencial de los ánodos no activos, por lo que, cada vía de degradación depende esencialmente del tipo de ánodo usado y de la naturaleza de los iones en solución (12), pero también de la estructura química del contaminante (13).

Los antibióticos se suelen clasificar según su espectro de acción, el mecanismo de acción o en función de la estructura química en: B-Lactámicos Glicopéptidos, Antraciclinas, Tetraciclinas, Sulfamidas y Quinolonas, entre otros (14). Estas diferencias han demostrado tener influencia en la aplicación de procesos por lo que el estudio de la eficiencia de los procesos electroquímicos frente a diferentes familias de antibióticos resulta relevante en el avance del estudio de estas técnicas con miras a la aplicación de tales tratamientos bajo condiciones reales.

2. Objetivos

2.1. General

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto de la estructura química en la degradación de antibióticos presentes en aguas durante la aplicación de procesos electroquímicos y de oxidación avanzada. Además de hacer un seguimiento a la evolución de su actividad antimicrobiana de las aguas tratadas pues la presencia de antibióticos promueve la generación de cepas multirresistentes, lo cual pone en riesgo la salud pública.

2.2. Específicos

- Estudiar las condiciones experimentales en las que se debe trabajar y seleccionar los antibióticos que son resolutivos.
- Evaluar la capacidad de la oxidación anódica con ánodos de Diamante dopado con boro (BDD) para la degradación y eliminación de la actividad antimicrobiana de antibióticos comúnmente en matrices acuosas.
- Evaluar la capacidad de oxidación electroquímica con ánodos de óxido de iridio para la degradación y eliminación de la actividad antimicrobiana de antibióticos comúnmente detectados en matrices acuosas.

3. Procedimiento Experimental y Metodología Analítica

3.1. Descripción de la instalación

Para llevar a cabo los ensayos de degradación se utilizaron dos celdas electrolíticas iguales (Figura 1) compuestas por:

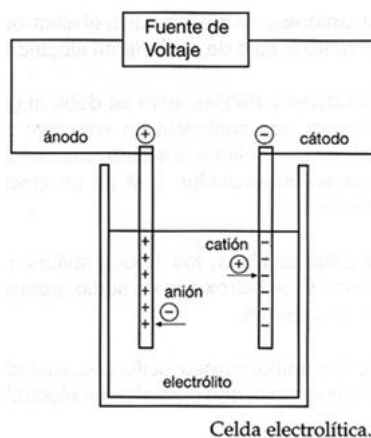


Figura 1 Esquema de celda electrolítica utilizada para los experimentos

- Recipiente de 350 mL de capacidad con una tapa que permite sostener los electrodos
- Cátodo inerte y los ánodos correspondientes a cada estudio (Figuras 2 y 3)
- 200 mL de solución de electrolito soporte 0,05 M (NaCl en el caso de ánodo de IrO_2 o Na_2SO_4 en la técnica con ánodo BDD) y antibiótico (0,1 mM)
- Fuente de corriente eléctrica con una intensidad de corriente de 20 mA

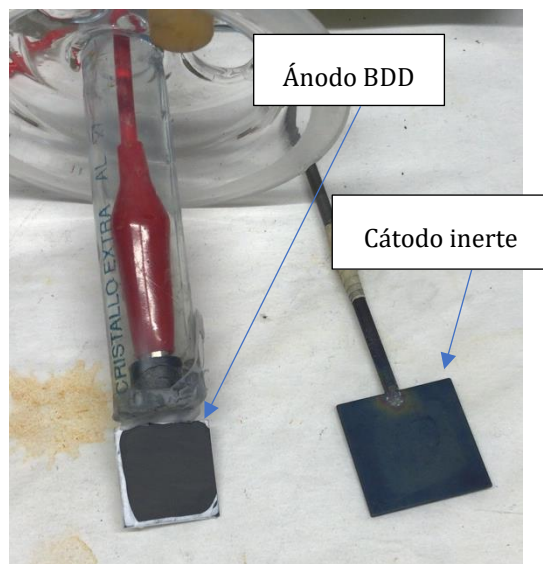


Figura 2 Ánodo BDD y cátodo inerte

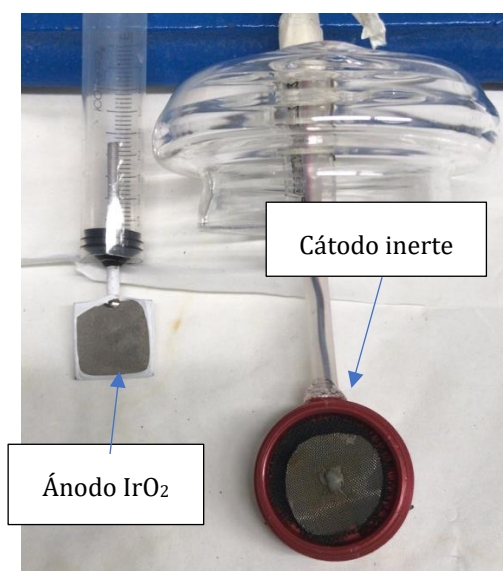


Figura 3 Ánodo de óxido de iridio y cátodo inerte

3.2. Preparación de la muestra

Previamente a la preparación de las disoluciones utilizadas en la realización de los experimentos, se realizan dos disoluciones, que se utilizarán posteriormente como disolvente

- NaCl con una concentración de 0,05 M en agua destilada
- Na₂SO₄ con una concentración de 0,05 M en agua destilada

Para realizar los experimentos de oxidación electroquímica con DSA, se preparan cuatro disoluciones con antibiótico de la siguiente composición

- Disolución de Penicilina G (1 mM) en NaCl (0,05 M)
- Disolución de Amoxicilina (1 mM) en NaCl (0,05 M)
- Disolución de Levofloxacin (1 mM) en NaCl (0,05 M)
- Disolución de Ciprofloxacina (1 mM) en NaCl (0,05 M)

Por otro lado, para los experimentos de oxidación avanzada se realizan otras cuatro:

- Disolución de Penicilina G (1 mM) en Na₂SO₄ (0,05 M)
- Disolución de Amoxicilina (1 mM) en Na₂SO₄ (0,05 M)
- Disolución de Levofloxacin (1 mM) en Na₂SO₄ (0,05 M)
- Disolución de Ciprofloxacina (1 mM) en Na₂SO₄ (0,05 M)

3.3. Ensayos de degradación de antibióticos

La realización de cada experimento requiere de:

1. Preparación de viales para la determinación de la concentración del antibiótico mediante HPLC y para realizar la AA.
2. Preparación de viales de mayor tamaño para la determinación del pH y COD (Carbono Orgánico Disuelto) con 40 mL de muestra.
3. Preparación de tubos de ensayo para la determinación de especies oxidantes. El contenido de los viales se explica detalladamente en el Anexo I.
4. Montaje de la celda electrolítica, a la que se adicionan la solución de antibiótico y electrolito soporte correspondiente y se conectan cátodo y ánodo, para permitir el paso de la corriente eléctrica.
5. Toma de muestras en los siguientes tiempos de reacción: 0, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos y se realizan los análisis correspondientes tanto en presencia como en ausencia de antibióticos

3.4. Parámetros de control y respuesta

3.4.1. Determinación concentración de Antibióticos

Para realizar el seguimiento de la concentración de los antibióticos elegidos se propuso inicialmente una técnica espectrofotométrica. Para ello se realizan barridos en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 20), desde 190 nm hasta 400 nm. Después de determinar la capacidad de respuesta de cada antibiótico propuesto, se llevan a cabo lecturas a diferentes concentraciones molares (0.013, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25) a la longitud de onda de máxima absorbancia, que permitirían construir las curvas de calibración, así como determinar los límites de detección y de cuantificación del método.

Se realizan análisis adicionales por HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia) mediante un cromatógrafo Autonijetwater 2695 que consta de una columna ACE C₁₈ superxcel de 3 mm (100 x 4,6) y un detector UV fijado a diferentes longitudes de onda en función del tipo de antibiótico. La fase móvil es acetonitrilo/disolución de ácido fórmico 0,02% en diferentes proporciones según el antibiótico usado, operando en modo isocrático a 30°C con un flujo de 1mL/min y un volumen inyectado de 10 µL. La concentración molar de los antibióticos por HPLC se conoce tras hacer con anticipación rectas de calibrado con concentraciones conocidas para cada antibiótico y descritas en el Anexo I.

3.4.2. Seguimiento de la Actividad Antibiótica

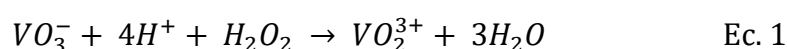
La actividad antibiótica se mide siguiendo la prueba de sensibilidad para antibióticos Kirby-Bauer (15), donde se siembra bacteria (16) (*S. aureus* o *E. coli*) a una concentración constante y se adicionan volúmenes específicos de muestra con antibiótico. Para conseguir una concentración constante, se inocula con un asa una disolución de NaCl 0.05M y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm (Anexo I).

Además, para definir los antibióticos que se van a utilizar, se repite el método de actividad antibiótica a distintas concentraciones de bacterias y adicionando

distintos volúmenes de muestra de esta forma se consigue optimizar la cantidad adicionada de muestra y la concentración de bacteria que se va a utilizar.

3.4.3. Detección y cuantificación de peróxido de hidrógeno

Para la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se utiliza metavanadato de amonio (NH_4VO_3) a una concentración de 0,0062 M, asegurando su exceso para garantizar la reacción completa del H_2O_2 (Ec. 1). (17)

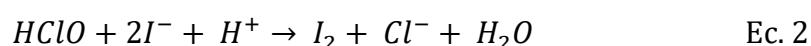


El metavanadato de amonio, al encontrarse en exceso, reacciona con todo el peróxido de hidrógeno presente en la matriz, formando una solución coloreada de peroxovanadio (VO_2^{3+}). La concentración final de peroxovanadio es leída a 450 nm, y será proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno.

Para llevar a cabo esta medición, se preparan tantos tubos de ensayo como muestras se van a coger con 1,2 mL NH_4VO_3 (0,006M) al que posteriormente se le adiciona 1,2 mL de muestra tomada a los tiempos estimados durante el experimento. Pasados cinco minutos de adicionar la muestra se mide en el espectrofotómetro. Se realiza previamente una curva de calibración, en la que se hacen reaccionar muestras con concentración conocida de H_2O_2 con NH_4VO_3 (0,006M). La construcción de esta recta de calibrado se encuentra detallada en el Anexo I.

3.4.4. Detección de especies activas de cloro

La determinación de especies activas de cloro se hace siguiendo el método indirecto yodométrico (18) basado en la siguiente reacción (Ec. 2):



El yoduro de potasio reacciona con las especies activas de cloro generando cloruros y yodo más agua. El yodo, que es una especie coloreada, es el que permite medir la absorbancia a una longitud de onda de 350 nm.

Para la cuantificación de las especies activas de cloro se preparan tubos de ensayo con las siguientes cantidades

1,35 mL KI (10%)+ 0,6 mL H₂O + 50 µL heptamolibdato de amonio (0,01 M)

donde posteriormente se añaden 0,6 mL de muestra recogida en cada tiempo. Tras cinco minutos, se lleva al espectrofotómetro para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Previamente, se realiza una curva de calibrado que relaciona la absorbancia con la concentración de especies activas de cloro, la cual se encuentra detallada en el Anexo I.

3.4.5. Medición de pH

El pH se usa principalmente para definir el grado de acidez de una muestra acuosa y para conocer el grado de oxidación del cloro en los experimentos en los que se generan especies activas de cloro, por lo que es necesario medir el pH al inicio y al final de los experimentos. Para la medición del pH se sigue el método estándar. (19)

Antes de realizar las mediciones, es importante calibrar el pH-metro, que se observa en la Figura 4, con las disoluciones estándar.

$$pH = -\log[H^+] \quad \text{Ec. 3}$$



Figura 4 Equipo utilizado en la determinación del pH

3.4.6. Determinación de Carbono Orgánico Disuelto

El Carbono Orgánico Disuelto corresponde a la suma de todos los compuestos orgánicos disueltos presentes en la muestra. A su vez, también hay presente en el agua Carbono Inorgánico (CI), que se encuentra disuelto en el agua en forma de CO_2 o en forma de compuestos inorgánicos como lo son los carbonatos y bicarbonatos. La suma de ambos tipos de carbono conforma el Carbono Total (CT), cumpliéndose la relación de la ecuación 4, sobre la cual está basado el funcionamiento del equipo empleado.

La medida del COD se utiliza para cuantificar la materia orgánica presente en el agua. Esta medición sigue el método estándar 5310 (20) Para ello se utiliza un equipo SHIMADZU, modelo TOC-VCSH.

$$COD = CT - C \quad \text{Ec. 4}$$

4. Resultados y análisis

4.1. Estandarización de métodos de control y respuesta

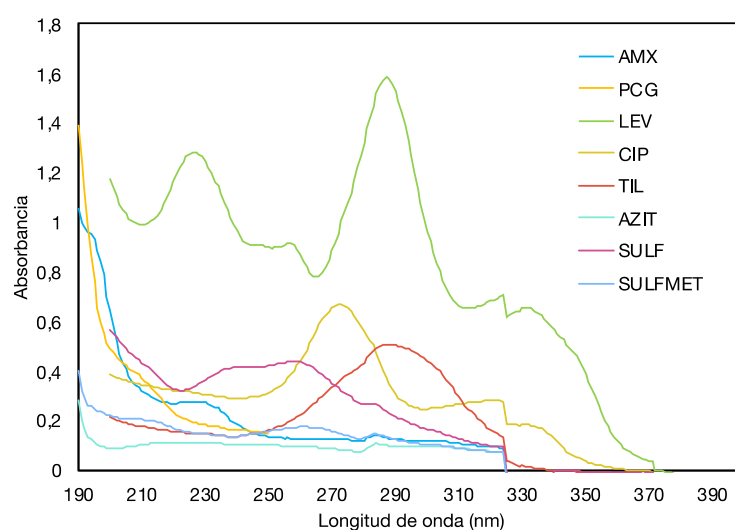
Para llevar a cabo la evaluación de procesos que buscan mejorar la calidad del agua, se requiere hacer seguimiento de la concentración del contaminante inicial, así como de la biodegradabilidad o de la mineralización que se alcanza tras la aplicación del tratamiento propuesto. En los compuestos con características antibióticas, además, resulta de suma importancia conocer la evolución de los productos obtenidos en función de la inhibición de crecimiento bacteriano (AA).

Para este trabajo, y tras una revisión bibliográfica, se eligen 6 de los antibióticos más consumidos (21) (5), pertenecientes a 3 familias. (Tabla 1)

Tabla 1 Familias de antibióticos y antibióticos seleccionados

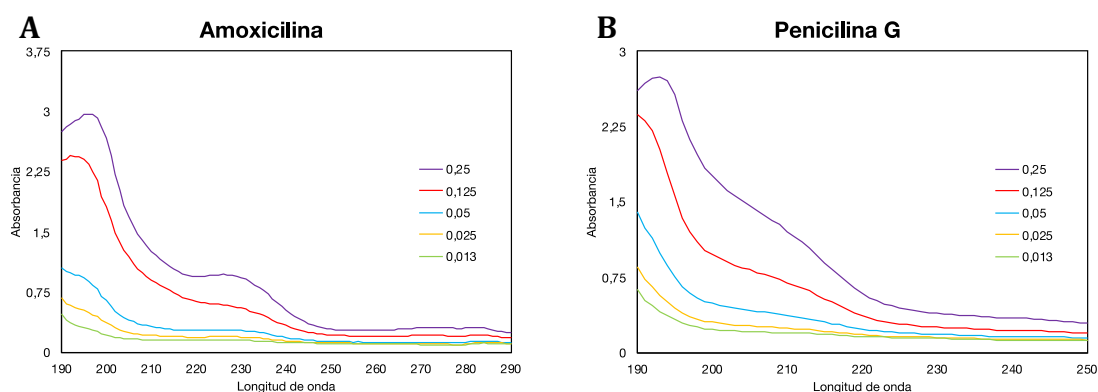
Familia	Antibióticos
Penicilinas	Amoxicilina, Penicilina G
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, Levfloxacina
Sulfamidas	Sulfadiazina, Sulfametoxazol

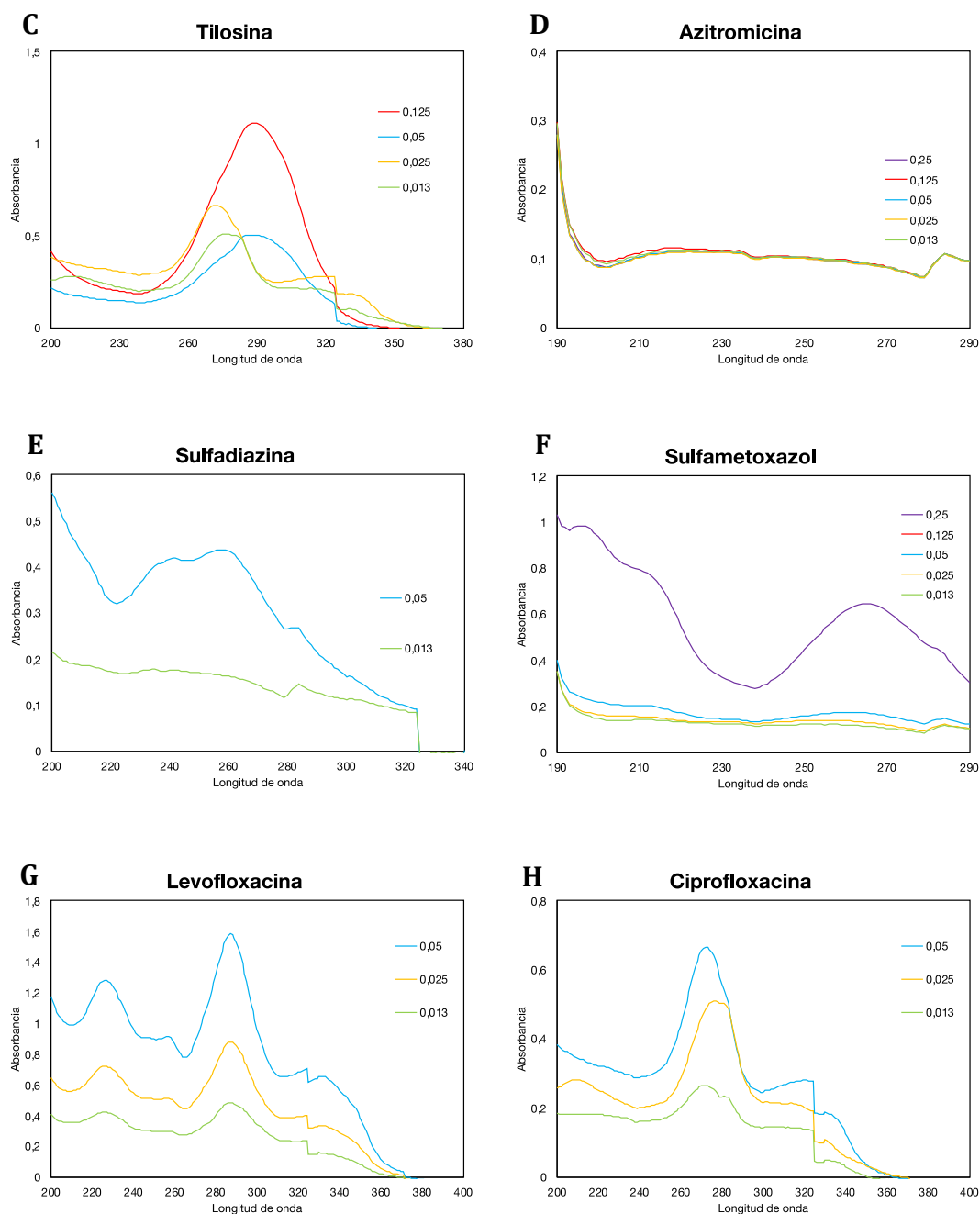
Inicialmente se lleva a cabo el estudio de la capacidad de detección de dichos antibióticos por espectrofotometría. Observando las gráficas 2E y 2F, se detecta que por espectrofotometría, las sulfamidas, son difíciles de seguir debido a que en bajas concentraciones, no se cumple la Ley de Beer. Por ello se añaden al estudio dos antibióticos de la familia de los macrólidos (Tilosina y Azitromicina). La gráfica 1 muestra un barrido desde 190 a 400 nm de estos ocho antibióticos y, como se puede observar, en las curvas de la Penicilina G, Amoxicilina, Levofloxacina, Ciprofloxacina, Sulfadiazina y Tilosina se detecta una longitud de máxima absorbancia clara a las longitudes de onda de 194, 192, 226, 205, 258 y 289, respectivamente. Sin embargo los dos restantes, Azitromicina y la Sulfametoxazol no emiten señal clara a la concentración utilizada.



Gráfica 1 Barrido espectrofotométrico de los antibióticos AMX, PCG, LEV, CIP, TIL, AZIT, SULF, SULFMET a una concentración de 0,05 mM

Con la intención de determinar un rango de concentraciones válido para realizar el seguimiento y, a la vez, confirmar la capacidad de respuesta de este método para el sulfametoxazol y la azitromicina, se llevaron a cabo los barridos a diferentes concentraciones que se muestran en la gráfica 2, donde se encuentra la absorbancia en función de la concentración de los antibióticos.





Gráfica 2 Conjunto de barridos espectrofotométricos de los antibióticos AMX, PCG, LEV, CIP, TIL, AZIT, SULF y SULFMET a distintas concentraciones en un rango de longitud de onda de 180 a 400 nm

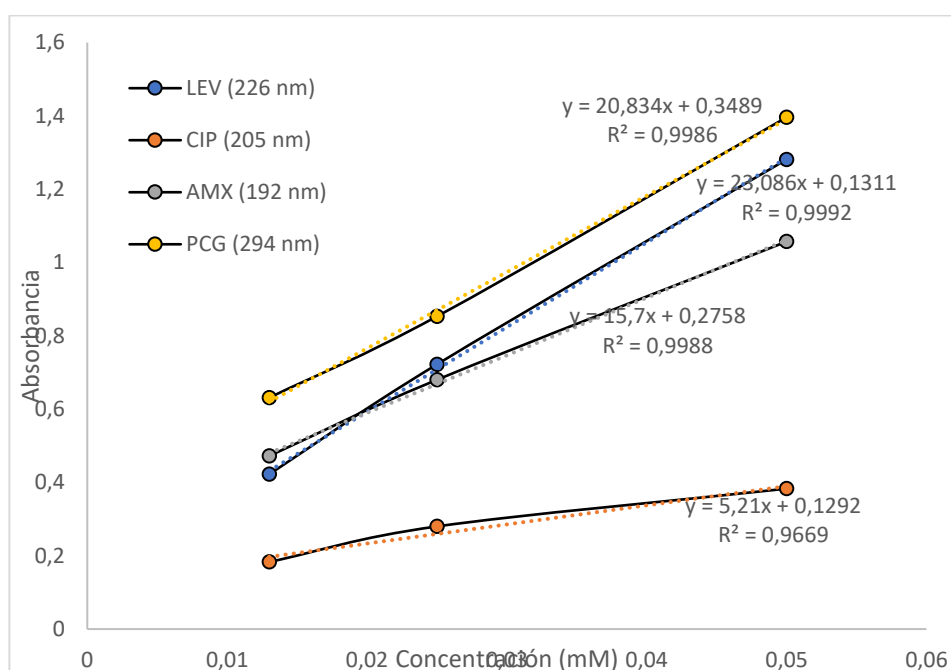
Como se puede observar, cuatro de los ocho antibióticos, Penicilina G, Amoxicilina, Levofloxacina y Ciprofloxacina, muestran una clara relación entre la concentración y la absorbancia, conforme con la ley de Beer (Ec. 5) es decir, que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del antibiótico y que,

por lo tanto, debería de haber una diferencia entre los valores de absorbancia de un mismo antibiótico a distintas concentraciones.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Ec. 5

Esto no ocurre para las gráficas de la azitromicina, sulfadiazina, sulfametoxazol y tilosina en las que se observa que a bajas concentraciones no absorben de forma proporcional. Por esto se procede a realizar las curvas de calibración para la penicilina G, amoxicilina, levofloxacin y ciprofloxacina. La gráfica 3 muestra que hay una alta linealidad de las rectas, por lo que son confiables y por tanto la capacidad de los métodos de cuantificación satisfacen los requisitos para la aplicación analítica deseada para esas cuatro moléculas.



Gráfica 3 Rectas de calibrado absorbancia vs concentración de LEV, CIP, AMX y PCG

De forma paralela al análisis espectrofotométrico, se llevó a cabo el estudio de las condiciones más favorables para evaluar la actividad antibiótica de los 10 antibióticos evaluados (Tabla 2). Para ello se modificaron variables como la cantidad de bacteria sembrada, la alícuota de muestra a sembrar, así como el

medio en el que era sembrado (sobre un medio poroso, papel, o directamente sobre el agar). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Resultados de las pruebas para la optimización de las condiciones de trabajo en la actividad antibiótica

CONDICIONES 1		10 μ L de muestra	0,1 absorbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Tilosina	Sulfadiazina, Penicilina G, Amoxicilina, Sulfametoxazol, Azitromicina, Levofloxacin, Ciprofloxacina	Tilosina	Sulfadiazina, Penicilina G, Amoxicilina, Sulfametoxazol, Azitromicina, Levofloxacin, Ciprofloxacina
CONDICIONES 2		50 μ L de muestra	0,05 absorbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Apramicina, Hirgomicina	Penicilina G, Amoxicilina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Levofloxacin, Ciprofloxacina	Apramicina, Hirgomicina	Penicilina G, Amoxicilina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Levofloxacin, Ciprofloxacina
CONDICIONES 3		50 μ L de muestra	0,02 absorbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Apramicina, Amoxicilina, Levofloxacin, Ciprofloxacina	Penicilina G, Hirgomicina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol	Apramicina, Amoxicilina, Penicilina G, Levofloxacin, Ciprofloxacina	Hirgomicina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol

Bajo las condiciones 1 en las que se añadieron 10 μ L de muestra con antibiótico en círculos de papel y con una concentración de bacteria correspondiente a 0,1 de

absorbancia, no se obtuvo halo de inhibición con la mayoría de los antibióticos propuestos (Tabla 2). De hecho, solo con la tilosina se obtuvo una incipiente respuesta. Esto, sumado a los experimentos de espectrofotometría, se descartó la inclusión de los macrólidos en el estudio y se incorporó la higromicina y la apramicina.

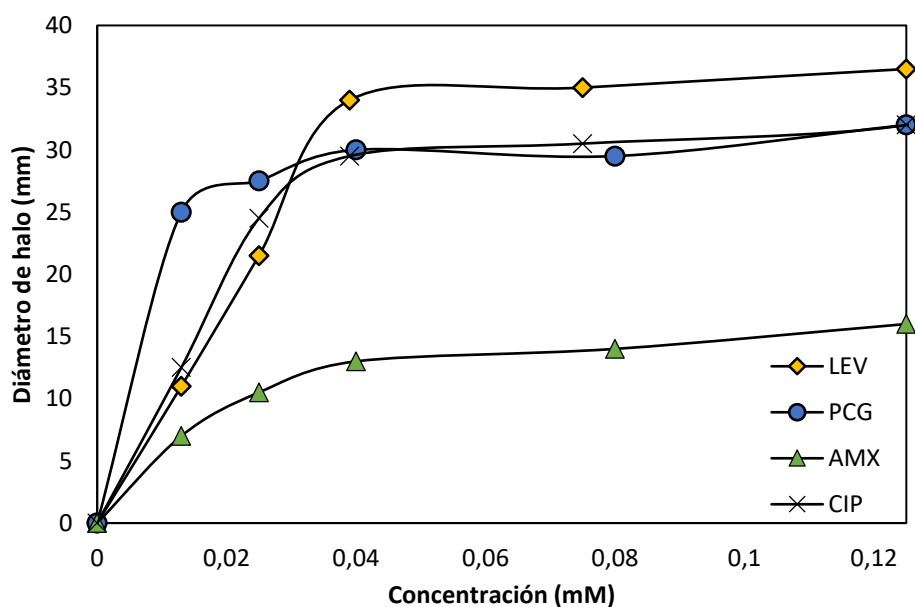
Bajo las condiciones enumeradas como 2, se disminuyó la concentración de bacterias sembradas y la concentración de antibiótico ya que la absorbancia de la suspensión bacteriana fue de 0,05 en lugar de 0,1 a 625 nm bacteria. Además, se adicionaron 50 μ L de muestra directamente en el agar, garantizando su dispersión radial mediante un sistema de contención usando aros circulares. Aun así, apramicina e higromicina fueron las únicas en las que se detectó halo claramente medible.

Bajo las condiciones número 3, se adiciona 0,66 μ L de muestra con antibióticos en aros ubicados sobre el agar, a una menor concentración de bacteria, correspondiente a 0,02 de absorbancia. En estas condiciones, se obtiene respuesta de la levofloxacin, ciprofloxacina, amoxicilina y apramicina para la *e. coli*, mientras que frente a la *s. aureus*, fueron la Levofloxacin, Ciprofloxacina, Amoxicilina y la Penicilina G las que mostraron halo de inhibición. Tras estos resultados, se descarta el estudio de la familia de las sulfamidas por la imposibilidad de seguir su actividad antibiótica y las dificultades para leer por espectrofotometría, además de que su baja solubilidad no permitiría realizar todos los experimentos bajo las mismas condiciones y por lo tanto, no serían resultados comparables.

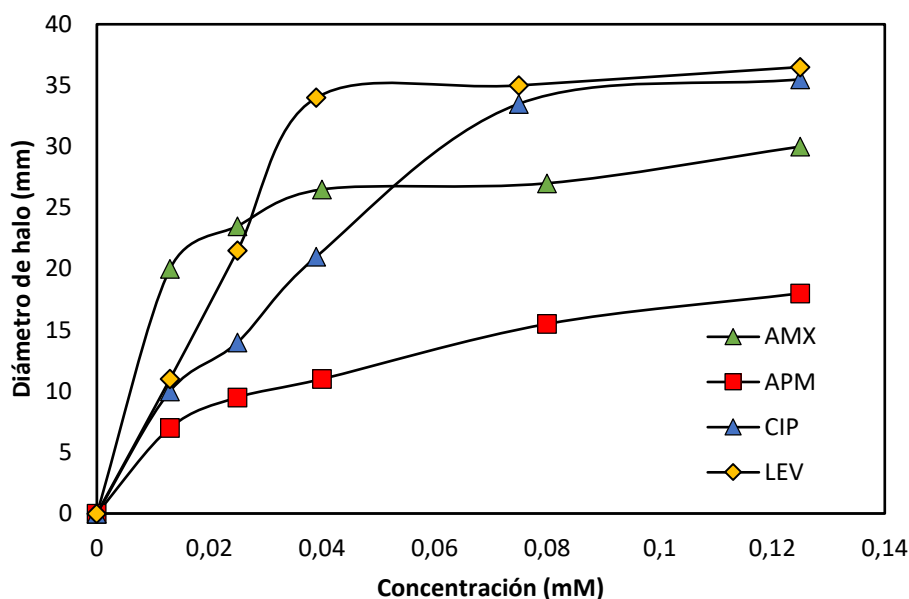
En las siguientes gráficas (4 y 5) se observa la relación entre la concentración y el diámetro de halo de cada uno de los antibióticos tanto para *e. coli* como *s. aureus*, útiles para determinar la evolución de la actividad antibiótica a lo largo de los experimentos realizados.

Una vez analizada esta etapa se considera que la degradación de compuestos orgánicos genera productos de gran similitud con la molécula inicial, los cuales absorben a la misma longitud de onda del compuesto de partida interfiriendo en el seguimiento, y se deduce que se requeriría su separación. Así que, una vez se determinó que la Levofloxacin, Ciprofloxacina, Penicilina G y Amoxicilina proporcionan una buena respuesta para el seguimiento de la AA con *s. aureus* y además pueden detectarse según su espectro de absorción, se acudirá a la separación y cuantificación usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV-VIS, sin la adición de compuestos adicionales para la derivatización.

Tras la decisión de seguir la concentración de los antibióticos mediante HPLC, se descartan la higromicina y la apramicina por su necesidad de adición de aditivos para la detección clara mediante HPLC. Posteriormente, debido a que de los cuatro antibióticos que finalmente se van a estudiar, solo tres dan respuesta frente a *e. coli*, se descarta el uso de esta bacteria quedando únicamente la *s. aureus* para el seguimiento de la actividad antibiótica.



Gráfica 4 Evolución del diámetro de halo dependiendo de la concentración de antibiótico con *s. aureus*



Gráfica 5 Evolución del diámetro de halo dependiendo de la concentración de antibiótico con *e. coli*

Se procede a fijar las condiciones más apropiadas para la detección y el seguimiento de la concentración por HPLC, apartado 3.4.1 y la creación de las curvas de calibración Anexo 1 para la Levofloxacin, Ciprofloxacina, Amoxicilina y Penicilina G.

Es conocido el desarrollo de nuevos antibióticos, en muchos casos, ocurre a partir de una estructura de base de origen sintético o natural con reconocida actividad en contra de la viabilidad microbiana, por lo que se adicionan de nuevos sustituyentes a la estructura inicial para potenciar su actividad o la selectividad. Tal es el caso de las dos familias usadas para este estudio, las fluoroquinolonas y los betalactámicos.

Las fluoroquinolonas, provienen de las quinolonas, una familia de antimicrobianos derivados del ácido nalidíxico (Figura 5), que se caracteriza por presentar una estructura de doble anillo que contiene de sustituyentes N en la posición 3 y 5. Las quinolonas evolucionaron a las fluoroquinolonas (FQs) al incluir un átomo de flúor en la posición 7 (Figura 6). Desde entonces las FQs se han clasificado en generaciones según su espectro de acción, las de “primera generación”, actúan en contra de enterobacterias y resultan inactivas contra Gram positivos y anaerobios, mientras que las de “segunda generación”, presentan mayor actividad sobre Gram

negativos y, generalmente, una actividad moderada sobre Gram positivos. Mientras que las de “tercera generación” tienen una mejor absorción por vía oral y mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, grampositivos y patógenos atípicos y las de cuarta generación aportan una mejora en la actividad frente a grampositivos y además una actividad buena frente a anaerobios, aunque disminuye su actividad frente a *P. aeruginosa*.

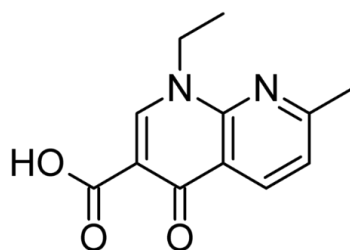


Figura 5 Molécula de ácido nalidíxico

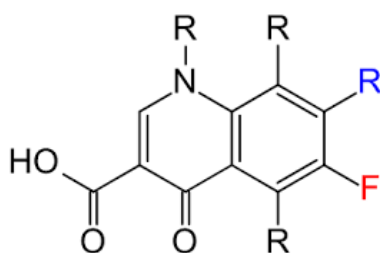


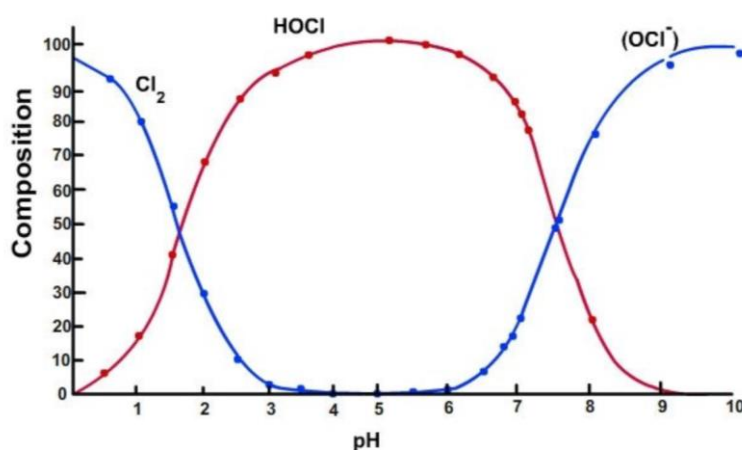
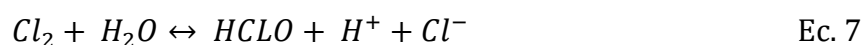
Figura 6 Molécula genérica de fluoroquinolona

Por otra parte, los antibióticos betalactámicos son un grupo de sustancias de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas. De acuerdo a su origen y espectro de acción pueden clasificarse en penicilinas naturales (G y V), penicilinas resistentes a las penicilinas estafilocócicas (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina).

4.2. Evaluación de procesos electroquímicos

4.2.1. Oxidación electroquímica con DSA

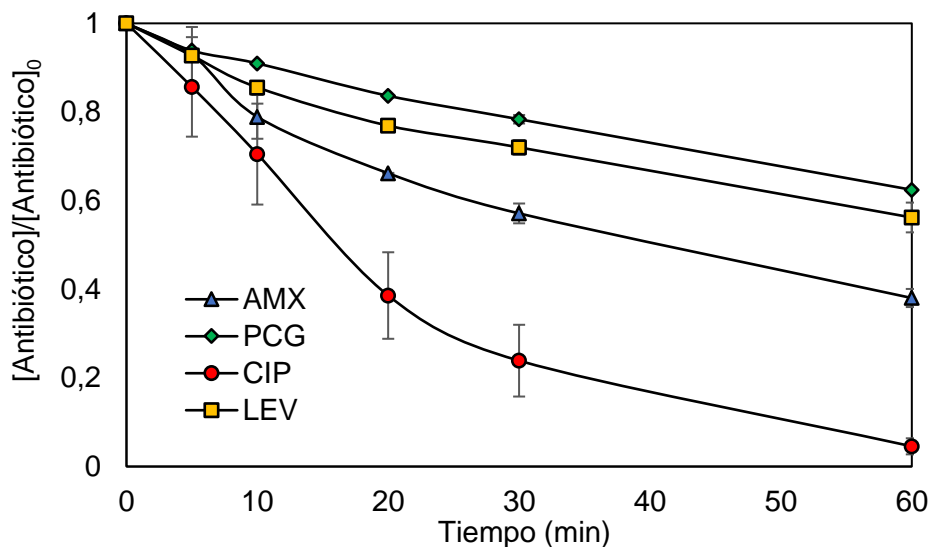
La oxidación electroquímica es un método en evolución utilizado para la eliminación de contaminantes emergentes en aguas que no pueden eliminarse por medio de métodos convencionales. Los ánodos dimensionalmente estables (DSA) se caracterizan por favorecer la oxidación de forma directa a través de la superficie del ánodo y mediada a través de especies activas de cloro teniendo como matriz una disolución de NaCl (22). La presencia de una especie en particular, depende del pH al que se encuentre la matriz, Cl_2 (hasta pH 4,9), HClO (entre pH 4,9 y pH 8,4) y ClO^- (hasta pH 14), como aparece en la gráfica 6.



Gráfica 6 Oxidación del cloro según pH

En la gráfica 7 se muestran los resultados de la evolución de la concentración, determinada mediante HPLC, de los antibióticos seleccionados. Estos experimentos se han realizado con ánodo DSA, en concreto de óxido de iridio, y un cátodo inerte introducidos en distintas matrices mencionadas en el apartado 3.2.

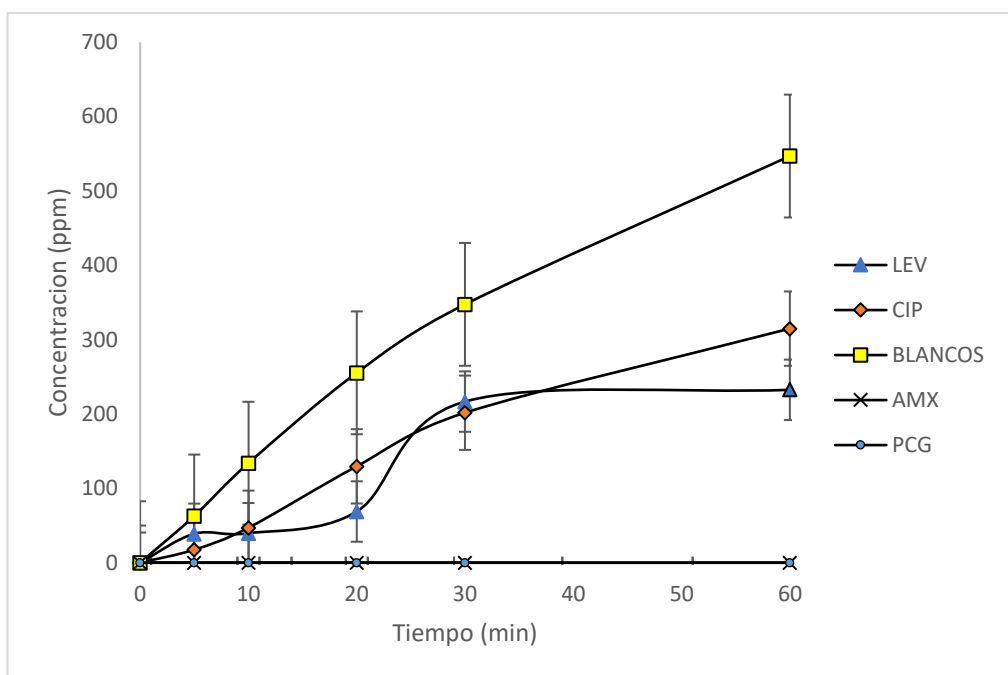
Cada uno de los antibióticos se ha evaluado de manera individual y por duplicado y la corriente aplicada a la celda electroquímica es de 20 mA.



Gráfica 7 Evolución de la concentración de los antibióticos con oxidación electroquímica DSA

Como se observa en la gráfica 7, los porcentajes de degradación son muy diferentes para cada uno de los antibióticos estudiados y se encuentran en el rango 25-95% de eliminación. La ciprofloxacina se elimina casi por completo (96%) a los 60 minutos de tratamiento, sin embargo, la penicilina G, levofloxacina y amoxicilina se eliminan un 38%, 44% y 62% respectivamente

Para comprobar las especies que participan en la degradación, se realiza un experimento adicional sin antibiótico. De esta forma, se determina que, en los experimentos sin antibiótico, la formación de especies activas de cloro va aumentando, sin embargo, cuando los experimentos se realizan con antibiótico, la evolución de la concentración de las especies activas de cloro es distinta. En la gráfica 8 se puede observar que la concentración de éstas es menor cuando se realizan los experimentos con antibiótico, esto se debe a que las especies activas de cloro no se acumulan en la matriz, si no que actúan modificando la molécula. El seguimiento del pH durante el proceso (valores entre 6.0 y 6.7) permite afirmar que según la grafica 6 el HClO sería la especie responsable de la transformación del contaminante.



Gráfica 8 Evolución de la concentración de especies activas de cloro con oxidación electroquímica DSA

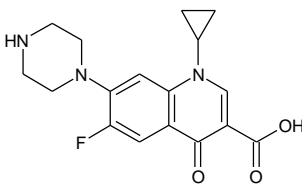
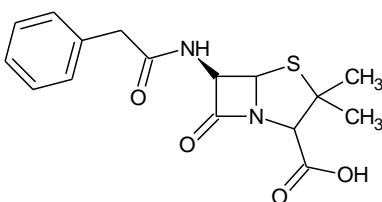
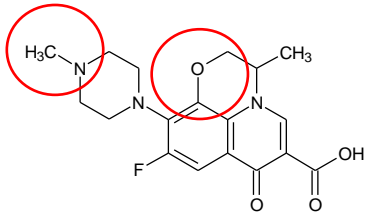
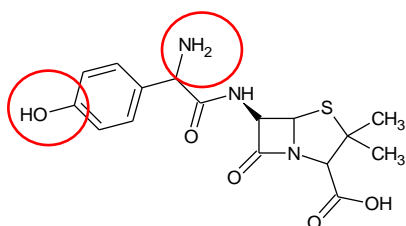
De la gráfica 8 se puede observar también que los antibióticos que pertenecen a la misma clase tienen perfiles de degradación diferentes. Esto indica que las pequeñas diferencias en la estructura química de los antibióticos probados tienen influencia en la degradación frente al HClO , y que tienen mecanismos de degradación diferentes porque hay más consumo para las betalactámicas que para las fluoroquinolonas.

El HClO generalmente reacciona con moléculas orgánicas a través de ataques electrofílicos (23). En las estructuras de las fluoroquinolonas, los grupos amino formados por los nitrógenos en los anillos de piperazilo, son sitios nucleofílicos (atraen electrófilos) debido a la deslocalización electrónica. Al observar la tabla 3, las estructuras de los antibióticos fluoroquinolónicos muestran que, a diferencia de la ciprofloxacina, la presencia de un metil como sustituyente en el nitrógeno 2 del anillo piperazil en la levofloxacina forma una amina terciaria, mientras que en la ciprofloxacina se forma una amina secundaria en esa posición.

Como es conocido la reactividad de estos compuestos nitrogenados es menor a medida que aumenta el número de hidrógenos sustituidos (aminas primarias > aminas secundarias > aminas terciarias). De ahí la menor degradación de la levofloxacina frente a la ciprofloxacina. Además, el átomo de carbono del benceno

ubicado en posición orto al piperazilo y posición meta al átomo de flúor se encuentra activo, y por tanto podría experimentar una sustitución aromática electrofílica, promovida por HClO. Por el contrario, en dicha posición en la Levofloxacinina está ocupada por la formación de un éter. Por lo tanto, la transformación de Levofloxacinina ocurre de una manera diferente a la ciprofloxacina.

Tabla 3 Estructura molecular de los antibióticos estudiados

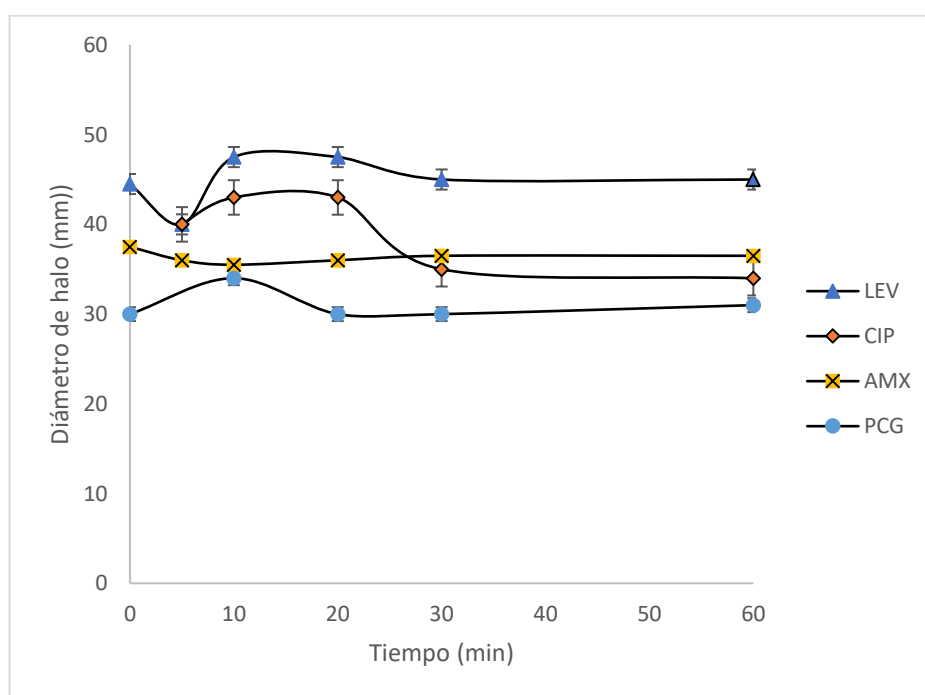
Fluoroquinolonas	Penicilinas
	
Ciprofloxacina	Penicilina G
	
Levofloxacinina	Amoxicilina

En forma análoga, al observar las estructuras de las penicilinas estudiadas, la amoxicilina presenta un grupo amino (primario) y un grupo hidroxilo adicionales, en comparación con la penicilina G (Tabla 3), por lo que estructuralmente sería más susceptible de sufrir una transformación generada por el HClO que la penicilina G, lo cual tiene sentido al considerar las diferencias obtenidas durante los ensayos de degradación.

Adicionalmente, se lleva a cabo el seguimiento de la actividad antibiótica y determinación del carbono orgánico disuelto antes y después de aplicar el proceso. En la gráfica 9 se observan los resultados de la actividad antibiótica correspondiente a los experimentos durante la oxidación usando el ánodo de IrO₂ (DSA). Se determina que la actividad antibiótica no disminuye luego del proceso lo que sugeriría que

durante la transformación de los compuestos de partida se podrían formar subproductos con actividad antibiótica. En tal caso, sería necesario aplicar mayor potencial eléctrico o exponer a las soluciones a un tiempo de tratamiento mayor.

Resulta importante considerar que la concentración usada para este trabajo de grado es mucho mayor a la detectada en aguas reales, esto con la intención de poder cuantificar el compuesto de partida, por lo que bajo condiciones reales los tiempos de exposición serían mucho menores.



Gráfica 9. Actividad antibiótica con oxidación electroquímica DSA

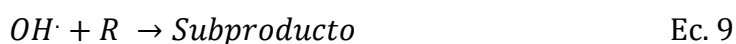
El carbono orgánico disuelto (tabla 4) demuestra que durante el proceso aplicado se alcanza una ligera mineralización durante el tratamiento con IrO₂, lo que sugiere la modificación de las moléculas a compuestos más oxidados que pueden aún mantener la actividad antibiótica.

Tabla 4 Resultados COT con oxidación electroquímica DSA

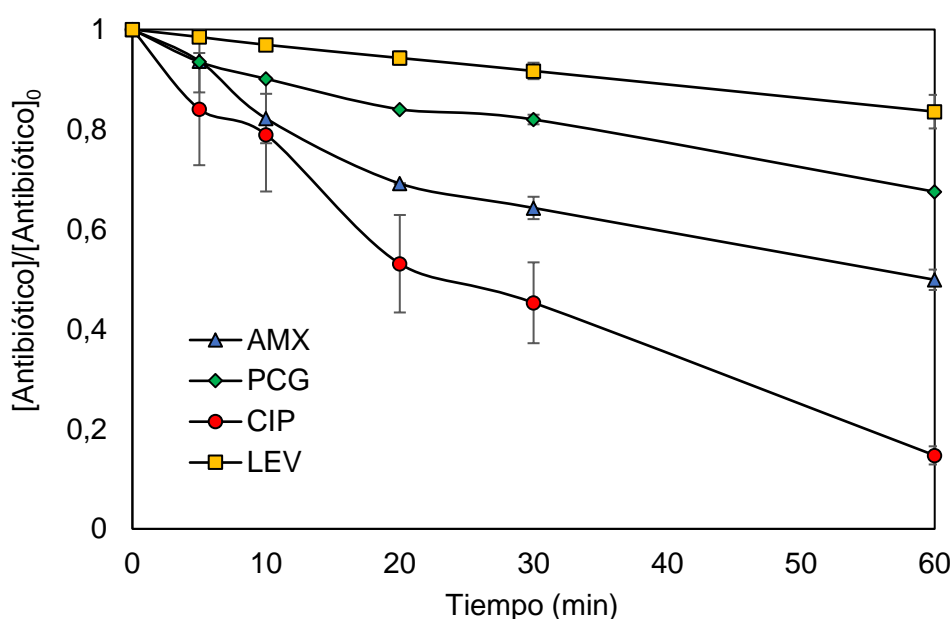
	COD inicial (mg/L)	COD final (mg/L)
Levofloxacina	21.00	20.72
Ciprofloxacina	21.23	17.62
Amoxicilina	20.80	18.56
Penicilina G	20.18	19.48

4.2.2. Oxidación avanzada con ánodo BDD

En los procesos electroquímicos de oxidación avanzada con ánodos BDD se genera radical hidroxilo que se desorbe en la superficie del ánodo quedando en la matriz y modificando la estructura de la molécula.



En la gráfica 10 se muestra la evolución de la concentración de los antibióticos objeto de estudio para las siguientes condiciones de operación. Se utiliza un ánodo de diamante dopado con boro (BDD) y un cátodo inerte sumergidos en distintas matrices para cada experimento descritas en el apartado 3.2. Para cada antibiótico se realiza un experimento de forma individual y por duplicado. Además, se aplica una corriente de 20 mA a la celda electroquímica.

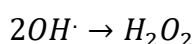


Gráfica 10 Evolución de la concentración de los antibióticos con oxidación avanzada BDD

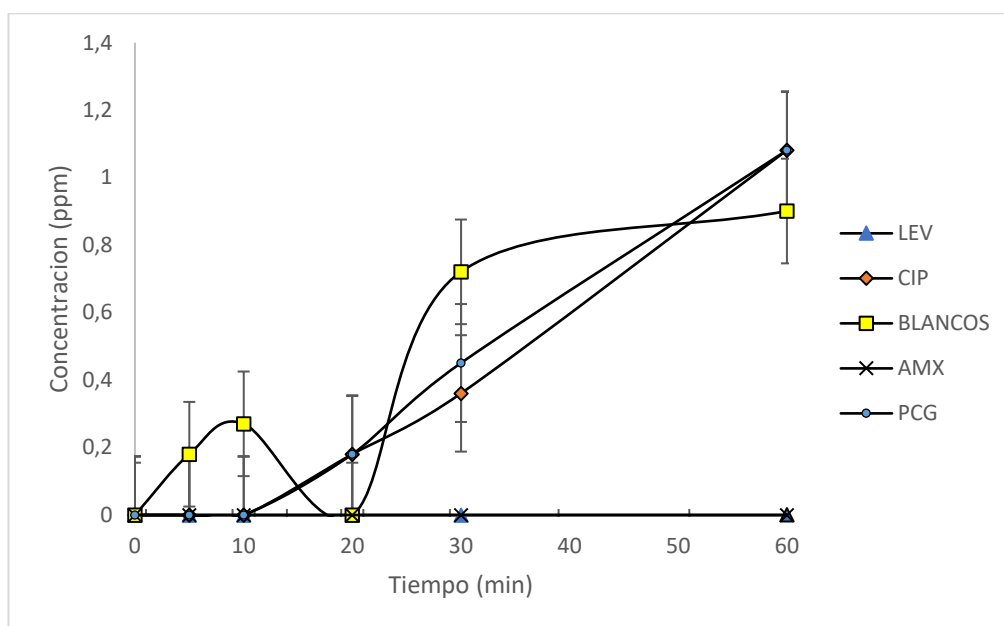
La evolución de la concentración con este método también alcanza mayores valores de degradación para la ciprofloxacina y amoxicilina, un 86% y un 51% respectivamente, su capacidad varía frente a la penicilina G y la Levofloxacina, pues

se invierte el orden de degradación, obteniéndose una degradación del 33% de la concentración inicial en la penicilina G y un 17% en la levofloxacin.

En el mismo sentido, para comprobar la oxidación de las moléculas mediante radicales hidroxilo, se realiza en las mismas condiciones que con molécula, un experimento sin molécula, en el que al estar en exceso estos radicales, se formaría peróxido de hidrógeno.



Ec. 11

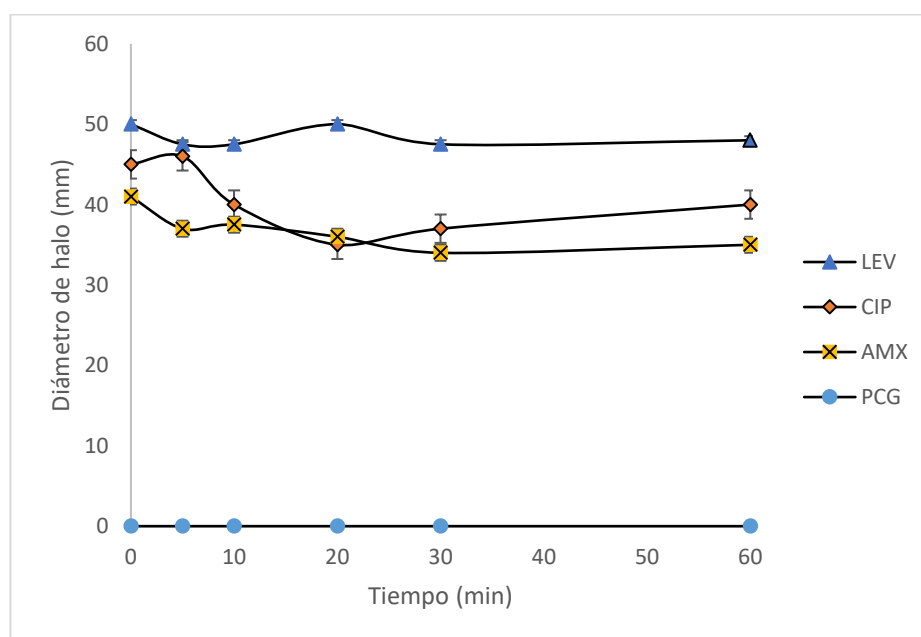


Gráfica 11 Evolución de la concentración de peróxido de hidrógeno con oxidación avanzada BDD

En la gráfica 11 se evidencia la formación de peróxido de hidrógeno en ausencia de antibióticos, sin embargo, en presencia de éstos, la acumulación de radical hidroxilo para la formación de H_2O_2 disminuye e incluso es nula para los experimentos con levofloxacina y amoxicilina. Se observa que para la ciprofloxacina y la penicilina G se sigue formando H_2O_2 pero en menor cantidad que en los experimentos sin adición de antibiótico ya que algunos de los radicales hidroxilos actúan en la modificación de las moléculas.

Estructuralmente, estudios previos han demostrado que la fracción del piperazilo y el anillo de benceno del sistema de quinolona en CIP tienen los valores más altos de densidad de electrones (24)(Tabla 3). En consecuencia, tales regiones parecen ser las más susceptibles a las reacciones con $\bullet\text{OH}$, mientras que la presencia del grupo metil en el anillo piperazilo y el grupo éter en la estructura de la levofloxacin afecta la nucleofilicidad de esta, haciéndola relativamente menos susceptible para el ataque de especies electrofílicas como el $\bullet\text{OH}$. Por otra parte, en las penicilinas, el anillo de benceno, el grupo tioéter, el anillo b-lactámico, las amidas secundarias y aminas primarias son las fracciones más susceptibles a agentes electrofílicos como $\bullet\text{OH}$, por lo cual la amoxicilina sería ligeramente más transformable que la Penicilina G, de ahí su menor degradación usando ánodos de BDD.

En la gráfica 12 se puede observar que todos los antibióticos iniciales y los generados tras la modificación de la molécula, tienen la misma actividad antibiótica, lo cual determina, de la misma forma que en los experimentos de oxidación electroquímica, que los subproductos formados durante el tratamiento, siguen teniendo actividad antibiótica.



Gráfica 12 Actividad antibiótica con oxidación avanzada BDD

Finalmente, la determinación del COD inicial y luego de la aplicación del tratamiento con ánodos de BDD, demuestra poca mineralización de los antibióticos tratados y, de manera similar a la degradación con ánodos de IrO₂, sustenta los resultados obtenidos para la actividad antibiótica, pues en el caso de la amoxicilina y ciprofloxacina, los compuestos de partida se transformarían a uno o más productos que pueden aún mostrar algún tipo de actividad letal para los microorganismos. Mientras que en el caso de la penicilina G y la Levofloxacina la poca diferencia del COD inicial y final y de la actividad antibiótica sería una consecuencia de la menor transformación durante el proceso empleado y a la concentración usada.

Tabla 5 Resultados COD con oxidación avanzada BDD

	COD inicial (mg/L)	COD final (mg/L)
Levofloxacina	20.52	20.03
Ciprofloxacina	19.28	18.63
Amoxicilina	19.04	18.67
Penicilina G	19.75	19.43

5. Conclusiones

Como conclusión de los estudios previos, se determina que únicamente pueden estudiarse la levofloxacina, ciprofloxacina, amoxicilina y Ppnicilina G, ya que las sulfamidas serán objeto de estudio de trabajos posteriores debido a su complejidad para cuantificarse y detectar su actividad antibiótica bajo las condiciones estimadas. Los antibióticos propuestos en sustitución de las sulfamidas también tuvieron que ser descartados, los macrólidos por motivos análogos a las mismas sulfamidas y la higromicina y apramicina por su necesidad de un tratamiento previo para el seguimiento por HPLC.

Además, se concluye que la actividad antibiótica debe realizarse adicionando 0,66 µL de muestra en una placa con bacteria al 0,02 de absorbancia obtenida a 625 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro. Esta actividad sólo será evaluada por *s. aureus* ya que la Penicilina G no efectúa respuesta frente a *e. coli*.

Como conclusión al método electroquímico por DSA se observa que dentro de la familia de las fluoroquinolonas, la ciprofloxacina se degrada mucho más rápido que

la levofloxacin debido a su mayor reactividad cedida por su estructura molecular, eliminándose el 96% de ciprofloxacina en el minuto 60 de experimento. En el caso de los betalactámicos, la amoxicilina, debido al grupo amino que forma su estructura molecular, es más susceptible a ser oxidada que la penicilina G y por ello, esta última, se degrada menos.

Para finalizar con este método, se determina que la actividad antibiótica no disminuye con respecto a la inicial y junto a la no disminución del carbono orgánico disuelto del inicio del tratamientos al final, se podría determinar que la molécula no se mineraliza sino que forma productos intermedios, algunos de los cuales pueden mantener la actividad antibiótica

La degradación de antibióticos mediante oxidación avanzada (BDD) logra porcentajes de degradación similares que en los experimentos con DSA, y es que, dentro de la familia de las fluoroquinolonas, la levofloxacin se degrada más lentamente que la ciprofloxacina y en los betalactámicos, se consigue mayor degradación en la amoxicilina que en la penicilina G debido a los cambios y la reactividad que la estructura molecular de la ciprofloxacina y la amoxicilina les concede. En general, y en diferencia con el método anterior, se observa menor porcentaje de degradación con respecto a la concentración inicial de todos los antibióticos que por métodos de oxidación electroquímica con DSA.

En este caso, la especie oxidante es el radical hidroxilo, que para estos experimentos, se acumula únicamente formando peróxido de hidrógeno en la degradación de ciprofloxacina y penicilina G, pero de menor forma que en el tratamiento aplicado a la matriz sin antibiótico, lo que sugiere la actuación del radical hidroxilo en la modificación de las moléculas.

Respecto a la actividad antibiótica, tras realizar los experimentos con BDD, se observa que la actividad antibiótica no disminuye con el tiempo y la cantidad de COD tampoco, por lo que, de manera análoga al resultado con el tratamiento de oxidación electroquímica con DSA, las moléculas no llegan a mineralizarse y los productos intermedios mantienen la actividad antibiótica.

6. Bibliografía

CITAS

1. <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/water/index.html>.
2. Agudelo, R.M. *El agua, el recurso estratégico del siglo XXI*. Medellín : Revista Facultad Nacional de Salud Pública (Universidad de Antioquia), 2005.
3. Nuñez, L., y otros. *Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario*. Buenos Aires : Cátedra de Higiene y Sanidad, 2012.
4. Gimeno, O. y Ortega, C. *Antibióterapia y salud pública ceterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos*. Zaragoza : Universiada de Zaragoza, 2005.
5. Joya, G.P. *Tratamiento de Aguas para la Eliminación de Antibióticos - Nitroimidazoles- mediante Adsorción sobre Carbón Activado y Tecnologías Avanzadas de Oxidación*. Granada : Tesis doctoral defendida en la Universidad de Granada, 2010.
6. <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>. 2017.
7. Vargas Marcos, F. *La contaminación ambiental como factor determinante de la salud*. Madrid : Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.
8. *Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece*. Esperbent, C. y Migliorati, M. Argentina : RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Vol 43. Num 1. pag 6-10, 2017.
9. Martín de Vidales, M.J. *Eliminación de Contaminantes Orgánicos Persistentes de Aguas Residuales mediante Oxidación Electroquímica con Ánodo de Diamante Dopado con Boro*. Ciudad Real : Tesis doctoral defendida en la Universidad de Castilla - La Mancha, 2015.
10. Gil, M.J., y otros. *Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos*. s.l. : Producción + Limpia. Vol. 7 Núm. 2 pág 52-73, 2012.

11. García-Gomez, C., Gortáres-Moroyoqui, P. y Droguí, P. *Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción*. Buenos Aires : Química Viva (Universidad de Buenos Aires) Vol. 10 Núm. 2 pág 96-105, 2011.
12. Jojoa Sierra, S. D. *Evaluación de métodos electroquímicos: oxidación anódica, electro fenton y electror-foto-fenton para la degradación de fluoroquinolonas en aguas*. Medellín : Trabajo fin de maestría defendido en la Universidad de Antioquia, 2015.
13. Palma-Goyes, R.E., y otros. *The abatement of indigo carmine using active chlorine electrogenerated on ternary Sb₂O₅-doped Ti/RuO₂-ZrO₂ anodes in a filter-press FM01-LC-reactor*. Medellín : Electrochimica Acta Vol. 174 pág 735-744, 2015.
14. *Principales grupos de antibióticos*. Seija, V. y Vignoli, R. s.l. : Temas de bacteriología y virología médica Cap. 34 pág 631-647.
15. Luz Stella, R. y Marin Castaño, D. *Metodologías para evaluar In Vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal*. Pereira : Scientia Et Technica (Universidad Tecnológica de Pereira) Vol. XV Núm. 42 pág 263-268, 2009.
16. <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>.
17. Terán Solíz, M.C. *Estudio de la aplicación de procesos de oxidación avanzada a aguas contaminadas*. Barcelona : Trabajo Fin de Grado defendido en la Universitat Politècnica de Catalunya, 2016.
18. Harp, D.L. *Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater*. s.l. : Technical Information Series Núm. 17, 2001.
19. *4500-H⁺ pH VALUE*. s.l. : Standard Methods , 2017.
20. *5310 Total Organic Carbon* . s.l. : Standard Methods, 2017.
21. *Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985-2000*. E, Lázaro Bengoa., M, Madurga Sanz. y F.J., Abajo Iglesias. Madrid : Medicina Clínica Vol. 118 pág 561-568, 2001.
22. Isarain, E., y otros. *Caracterización de ánodos de PtPdOx y RuO₂ usados en una celda electroquímica para la eliminación de cloruro de metiltionina en una solución*

sintética. Mérida : Ingeniería (Universidad Autónoma de Yucatán) Vol. 16 Núm. 2 pág. 131-140, 2012.

23. Serna-Galvis, E.A., y otros. *Structure-reactivity relationship in the degradation of three representative fluoroquinolone antibiotics in water by electrogenerated active chlorine*. Medellín : Chemical Engineering Journal Vol. 315 pág 552-561, 2016.

24. Serna-Galvis, E.A., y otros. *Degradation of highly consumed fluoroquinolones, penicillins and cephalosporins in distilled water and simulated hospital wastewater by UV254 and UV254/persulfate processes*. Medellín : Water Research Vol. 122 pág. 128-138, 2017.

OTRAS CONSULTAS

- Dhandapani, Dr. Ramkumar. *¿Qué es el HPLC y cómo funciona?* s.l. : Science Unfiltered, 2017.
- Rodríguez Nava, C.O. *Evaluación de la remoción de fármacos presentes en agua residual mediante dos procesos combinados: oxidación electroquímica-lodos activados y oxidación enzimática-lodos activados*. México : Universidad Autónoma Metropolitana, 2017.
- Castañeda, R., y otros. *Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla margarita, Venezuela*. Venezuela : SABER. Revista multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, 2009.
- Navarro, O.E. *Representación social del agua y de sus usos*. Barranquilla : Psicología desde el Caribe Núm. 14 pág. 222-236 (Universidad del Norte), 2004.
- Maguiña-Vargas, C., Ugarte-Gil, C.A. y Montiel, M. *Uso adecuado y racional de los antibióticos*. Lima : Acta Médica Peruana Vol. 23 Núm. 1, 2006.
- Maddaleno Toledo, A.E. *Determinación del periodo de carencia de tilosina en huevos obtenidos de gallinas de postura*. Santiago : Trabajo defendido en la Universidad de Chile, 2013.

- Damià Baceló, L.; Lopez de Alda, M.J. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Barcelona : Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales - CSIC.



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ANEXO I

METODOLOGÍA ANALÍTICA DE PROCESOS FÍSICO QUÍMICOS

Autora:

Andrea Dobato Amorós

Directora:

Rosa Mosteo Abad

Codirectora:

Sindy Dayana Jojoa

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2018/2019

Índice

1. Actividad antibiótica	3
2. Determinación de peróxido de hidrógeno	5
3. Especies activas de cloro.....	12
4. Medidas con HPLC	15
5. Barridos espectrofotométricos	17

1. Actividad antibiótica

El seguimiento de la actividad antibiótica se basa en determinar si los antibióticos, conforme pasa el tiempo de tratamiento en los experimentos, pierden su actividad frente a las bacterias o no y para ello, se realizan los estudios en base a la prueba de sensibilidad de Kirrby-Bauer.

Siguiendo esta prueba, se realizan dos pasos previos a la adición de antibiótico:

- I. Se preparan placas Petri con medio Agar Nutritivo. Con un asa, se adiciona bacteria (Figura 1) para posteriormente, meterla en la estufa 24 horas a una temperatura de 37 °C.

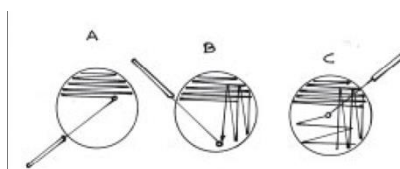


Figura 7 Método de siembra

- II. Se diluye bacteria de las placas anteriores en NaCl 0,05M para sembrarla con un bastoncillo en placas previamente preparadas con medio Müller Hilton.

De esta forma, las placas ya estarían preparadas para adicionar las muestras.

Inicialmente se eligieron los antibióticos, Tilosina, Sulfadiacina, Penicilina G, Amoxicilina, Sulfametoxasola, Azitromicina, Levofloxacin y Ciprofloxacina y se comprobó si las bacterias *Escherichia coli* (E-coli) y *Staphylococcus aureus* (S. aureus) eran resistentes a dichos antibióticos en las condiciones que se indican en la Tabla 1.

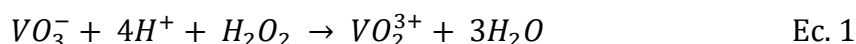
Tabla 6 Condiciones de operación de las pruebas para la actividad antibiótica

CONDICIONES 1		10 μ L de muestra	0,1 absorbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Tilosina	Sulfadiazina, Penicilina G, Amoxicilina, Sulfametoxazol, Azitromicina, Levofloxacina, Ciprofloxacina	Tilosina	Sulfadiazina, Penicilina G, Amoxicilina, Sulfametoxazol, Azitromicina, Levofloxacina, Ciprofloxacina
CONDICIONES 2		50 μ L de muestra	0,05 absorbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Apramicina, Hirgomicina	Penicilina G, Amoxicilina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Levofloxacina, Ciprofloxacina	Apramicina, Hirgomicina	Penicilina G, Amoxicilina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Levofloxacina, Ciprofloxacina
CONDICIONES 3		50 μ L de muestra	0,02 asborbancia de bacteria
<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
Con halo	Sin halo	Con halo	Sin halo
Apramicina, Amoxicilina, Levofloxacina, Ciprofloxacina	Penicilina G, Higromicina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol	Apramicina, Amoxicilina, Penicilina G, Levofloxacina, Ciprofloxacina	Higromicina, Sulfadiazina, Sulfametoxazol

2. Determinación de peróxido de hidrógeno

El proceso de determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se ha aplicado para seguir la evolución de las reacciones de degradación mediante procesos de oxidación avanzada en los que interviene el H_2O_2 .

En el proceso se da la siguiente reacción (Ec. 1):



Para realizar el experimento, se añade metavanadato de amonio (MVO_3) en exceso, de forma que, todo el peróxido de hidrógeno reaccione. La concentración final de peroxovanadio (VO_2^{3+}) es igual a la de peróxido de hidrógeno.

Para poder hacer un seguimiento de la concentración de peróxido de hidrógeno en los experimentos, se realiza una recta de calibrado, midiendo la absorbancia a 450 nm para concentraciones conocidas.

Además, se debe valorar con $KMnO_4$ (0,028 M) el H_2O_2 que se va a utilizar para poder ajustar la recta de calibrado a los valores reales de concentración de H_2O_2 .

Valoración de la disolución de 3000 ppm de H_2O_2 con $KMnO_4$ (0,028 M)

Se añade en un tubo de ensayo, 1 mL de la disolución de concentración conocida de H_2O_2 con 2 mL de H_2SO_4 (2 N) y se valoran con permanganato de potasio obteniendo los resultados de la Tabla 2, siendo volumen 1, volumen 2 y volumen 3 el volumen de permanganato de potasio consumido en cada una de las tres valoraciones.

Tabla 7 Resultados de la valoración con permanganato de potasio

Volumen 1 (mL)	Volumen 2 (mL)	Volumen 3 (mL)	Prom	S
0,72	0,71	0,70	0,71	0,01

Con los valores de volumen consumido de permanganato de potasio en la valoración, se determina la concentración real de H₂O₂.

Conociendo la concentración de permanganato y el volumen consumido, se puede calcular el número de moles de peróxido de hidrógeno que han reaccionado y, por lo tanto, la concentración de la disolución, mediante la estequiometría de la reacción (Ec. 2).



Concentración: 1666 ppm

Teniendo en cuenta el valor de la concentración real de la disolución inicial, las concentraciones de las disoluciones preparadas a partir de la misma en ppm quedan de la siguiente forma (Tabla 3), ya que se prepararon sin tener en cuenta la valoración.

Tabla 8 Cálculo de la concentración real de las disoluciones

[H ₂ O ₂] (ppm)	[H ₂ O ₂] (ppm) Real
Blanco	Blanco
0,5	0,28
1	0,55
5	2,77
10	5,54
20	11,16
50	27,72
100	55,48
200	111,62
300	166,60
500	276,56

Realización recta de calibrado

Se parte de una disolución de H_2O_2 al 30 % (v/v) con una densidad de 0,91 kg/L.

Como se quiere trabajar en partes por millón, se calcula la concentración de dicha disolución en ppm (Ec. 3 y Ec. 4).

$$\frac{mg}{L} = ppm \quad \text{Ec. 3}$$

$$\frac{30 \text{ mL } H_2O_2}{100 \text{ mL dis}} \times \frac{1,45 \text{ g } H_2O_2}{1 \text{ mL } H_2O_2} \times \frac{1000 \text{ mg } H_2O_2}{1 \text{ g } H_2O_2} \times \frac{1000 \text{ mL dis}}{1 \text{ L dis}} = 435000 \frac{\text{mg } H_2O_2}{\text{L dis}} \quad \text{Ec. 4}$$

$$= 435000 \text{ ppm } H_2O_2$$

Conocida la concentración en ppm, se preparan 250 mL de disolución a 3000 ppm. Para ello, se calculan los mL necesarios de la disolución de 435000 ppm a añadir, en un matraz de $250 \pm 0,25$ mL para formar la disolución a la concentración necesaria (Ec. 5, Ec. 6 y Ec. 7).

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad \text{Ec. 5}$$

$$3000 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL} = 435000 \text{ ppm} \times V \text{ añadir} \quad \text{Ec. 6}$$

$$V \text{ añadir} = 1,72 \text{ mL} \quad \text{Ec. 7}$$

A partir de esta disolución se pararán las demás. En las tablas aparece, en la primera columna, la concentración de la disolución nueva, en la segunda columna, el volumen de disolución que se va a realizar, y en la tercera el volumen añadido de disolución más concentrada.

- Disoluciones preparadas a partir de la disolución de 3000 ppm (Tabla 4)

Tabla 9 Preparación de disoluciones a partir de 3000 ppm

Concentración	Volumen disolución	Volumen añadido (3000 ppm)
1000 ppm	10 mL	3,33 mL
500 ppm	10 mL	1,66 mL
300 ppm	25 mL	2,5 mL
200 ppm	10 mL	0,67 mL

- Disoluciones preparadas a partir de la disolución de 50 ppm (Tabla 5)

Tabla 10 Preparación de disoluciones a partir de 50 ppm

Concentración	Volumen disolución	Volumen añadido (3000 ppm)
10 ppm	10 mL	2 mL
5 ppm	10 mL	1 mL
1 ppm	10 mL	0,2 mL
0,5 ppm	10 mL	0,1 mL

Una vez hechas todas las disoluciones, se preparan para medir en el espectrofotómetro, por duplicado, y a una longitud de onda de 450 nm.

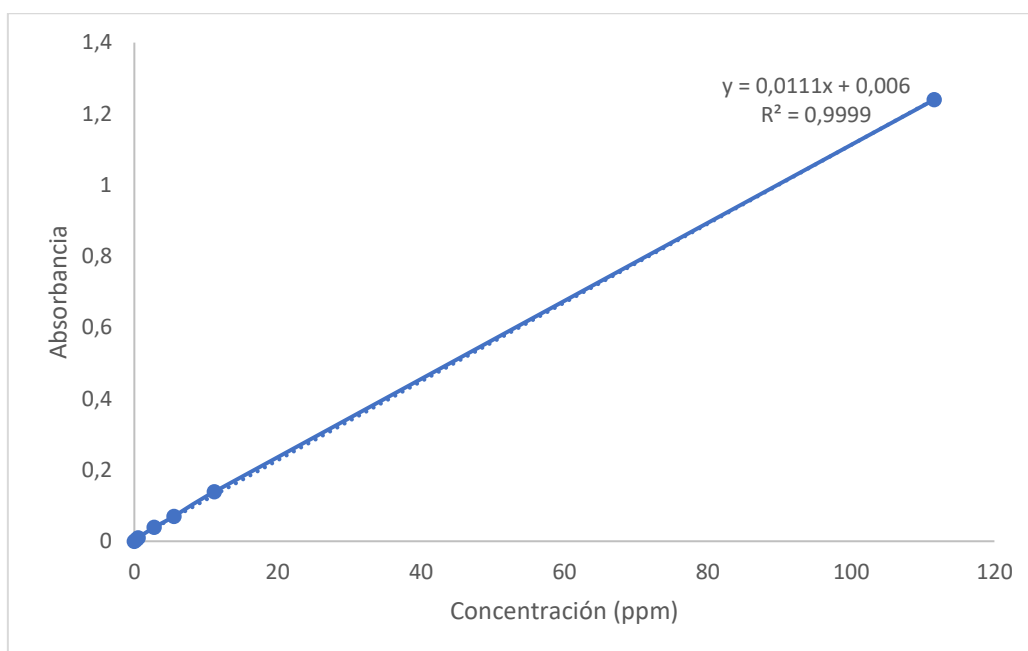
La composición de los viales es de 1,2 mL de muestra y 1,2 mL de metavanadato. Además, se hace un blanco (que se medirá tras hacer cero en el espectrofotómetro con agua destilada) con 1,2 mL de H₂O y 1,2 mL de MVO₃.

Tras pasar todas las muestras por el espectrofotómetro, se obtienen los resultados de la tabla 6. Las columnas en las que aparece la medida real es la absorbancia medida por el espectrofotómetro multiplicada por 2, ya que la muestra está diluida al 50 %. Además, se ha calculado la media ponderada de ambas medidas reales y la desviación típica.

Tabla 11 Resultados de la absorbancia de las disoluciones de peróxido de hidrógeno

[H2O2] (ppm)	Abs medida A	Abs real A	Abs medida B	Abs real B	\bar{x}	S
Blanco	0,011	0,022	0,011	0,022	0,022	0,00000000
0,5	0,002	0,004	0,002	0,004	0,004	0,00000000
1	0,004	0,008	0,006	0,012	0,01	0,00282843
5	0,02	0,04	0,019	0,038	0,039	0,00141421
10	0,035	0,07	0,035	0,07	0,07	0,00000000
20	0,069	0,138	0,07	0,14	0,139	0,00141421
50	0,171	0,342	0,171	0,342	0,342	0,00000000
100	0,312	0,624	0,317	0,634	0,629	0,00707107
200	0,616	1,232	0,624	1,248	1,24	0,01131371
300	0,723	1,446	0,719	1,438	1,442	0,00565685

Con estos datos se grafica la recta de calibrado (Gráfica 1)



Gráfica 13 Gráfica de calibrado de absorbancia vs concentración de peróxido de hidrógeno

Para comprobar esta recta se preparan dos disoluciones de concentración 15 y 75 ppm, adicionando 3 mL de la disolución de 50 ppm y 2,5 mL de la disolución de 300 ppm respectivamente, en matraces de 10 mL y enrasando con agua destilada. (Tabla 7)

Tabla 12 Disoluciones preparadas para la comprobación de la recta de calibrado

Concentración	Volumen disolución	Volumen añadido
15 ppm	10 mL	3 mL (50 ppm)
75 ppm	10 mL	2,5 mL (300 ppm)

De esta forma, se sigue el mismo procedimiento con los viales y se miden en el espectrofotómetro (Tabla 8), para con esta medida, comprobar la validez de la recta (Tabla 9).

Tabla 13 Verificación de la recta de calibrado

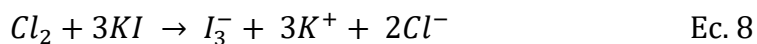
Verificación recta de calibrado							
[H2O2] (ppm)	[H2O2] (ppm) Real	Abs medida A	Abs real A	Abs medida B	Abs real B	\bar{x}	S
15	8,32	0,054	0,108	0,054	0,108	0,108	0,000
75	41,65	0,265	0,53	0,266	0,532	0,531	0,001

Tabla 14 Comprobación de la recta de calibrado

Comprobación recta de calibrado				
[H2O2] teórica(ppm)	[H2O2] teórica real (ppm)	Abs media	Recta	Conc con recta de calibrado
15	8,32	0,108	$y = 0,0111x + 0,006$	9,19
75	41,65	0,532	$y = 0,0111x + 0,006$	47,39

3. Especies activas de cloro

La reacción en la que se basa el método de detección de especies activas de cloro en los experimentos realizados con ánodo recubierto por óxido de iridio es la que se indica en la ecuación 8

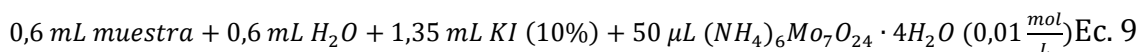


Previamente a los experimentos, se debe realizar una recta de calibrado, para posteriormente, poder determinar la concentración de especies activas de cloro mediante la absorbancia.

Se parte de una disolución de NaClO al 7% en peso, correspondiente a 80460 ppm. A partir de esta disolución, se prepara otra de 150 ppm añadiendo 0,187 mL de la más concentrada y enrasando con agua destilada en un matraz con volumen 100 mL.

A partir de esta última, se realizan las disoluciones que se muestran a continuación.

Siguiendo el método, se adiciona en los viales (Ec. 9):



Y se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm obteniéndose los resultados de la tabla.

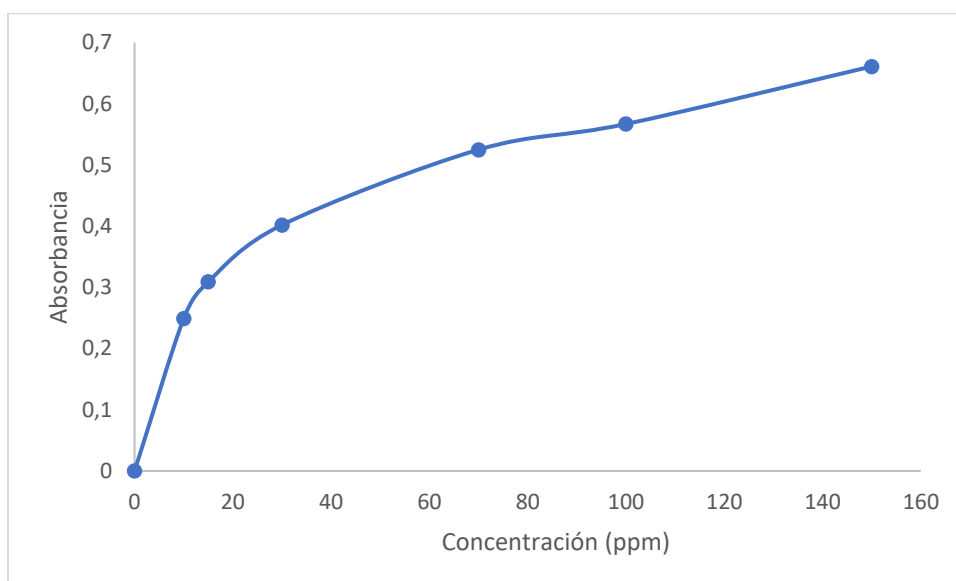
En la primera columna de la tabla 10 aparece la concentración de la muestra, la segunda columna son los mL añadidos de la disolución más concentrada (150 ppm), la tercera y cuarta columna son las absorbancias obtenidas en el

espectrofotómetro del vial, la quinta columna es la media de dichas absorbancias y la sexta es la absorbancia multiplicada por dos debido a que la muestra estaba diluida al 50 % con agua destilada.

Tabla 15 Resultados de absorbancia de las distintas concentraciones de especies activas de cloro

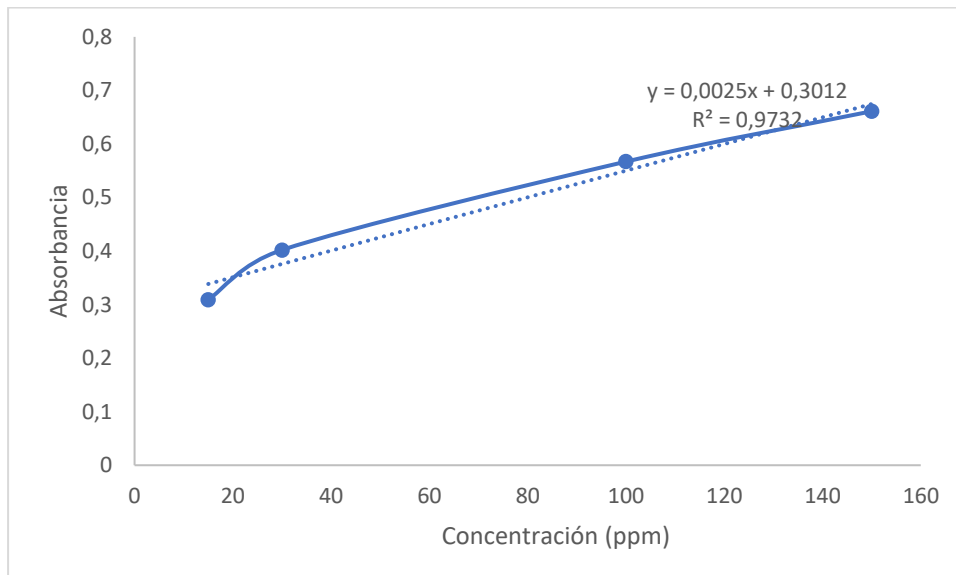
Concentración (ppm)	mL añadidos (150 ppm)	Absorbancia medida A	Absorbancia medida B	Absorbancia media	Absorbancia real
Blanco		0,08	0,09	0,085	0,17
150		0,331	0,33	0,3305	0,661
100	6,67	0,267	0,3	0,2835	0,567
70	4,67	0,263	0,262	0,2625	0,525
30	2	0,201	0,201	0,201	0,402
15	1	0,152	0,157	0,1545	0,309
10	0,67	0,11	0,109	0,1095	0,219
5	0,33	0,121	0,128	0,1245	0,249
1	2 (de 5 ppm)	0,037	0,035	0,036	0,072

Una vez obtenidos estos datos, se grafican obteniéndose lo siguiente (Gráfica 2):



Gráfica 14 Recta de calibrado para la determinación de especies activas de cloro

Para trabajar con más exactitud, se determina como recta de calibrado la parte lineal de la gráfica anterior (Gráfica 3).



Gráfica 15 Recta de calibrado para la determinación de especies activas de cloro (parte lineal)

4. Medidas con HPLC

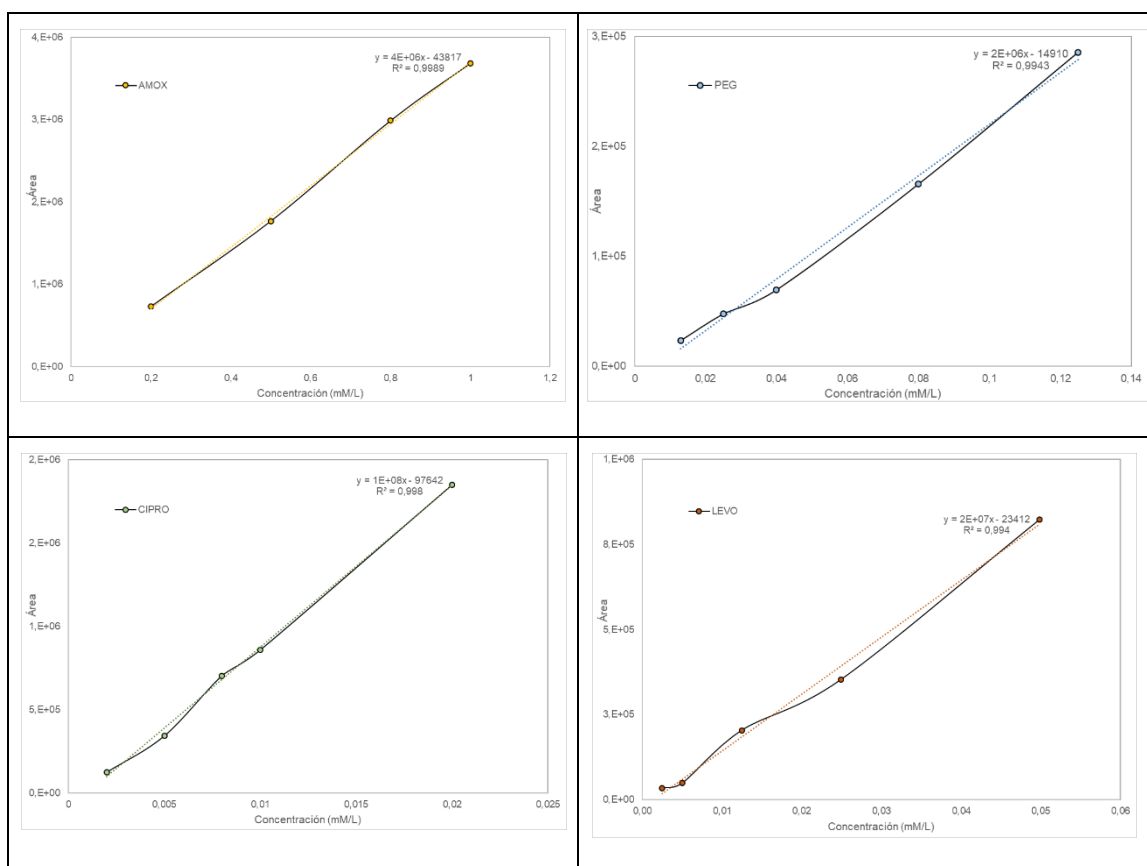
La cromatografía de líquidos es una técnica que permite separar moléculas para seguir la concentración de cada uno de los antibióticos a diferentes tiempos en los experimentos.

En este caso, se han realizado rectas de calibrado previas para todos los antibióticos que se van a tratar, de esta forma, cuando se obtienen resultados de los experimentos, se puede conocer la concentración real en cada tiempo de cada antibiótico.

Estas rectas de calibrado se han realizando pasando por HPLC disoluciones de concentración conocida y obteniendo el área que forman en la lectura de las mismas.

En la tabla 11 están las gráficas donde aparecen los cuatro antibióticos que se utilizarán en los experimentos.

Tabla 16 Tabla de gráficas de rectas de calibrado de AMOX, PEG, CIPRO y LEVO por HPLC

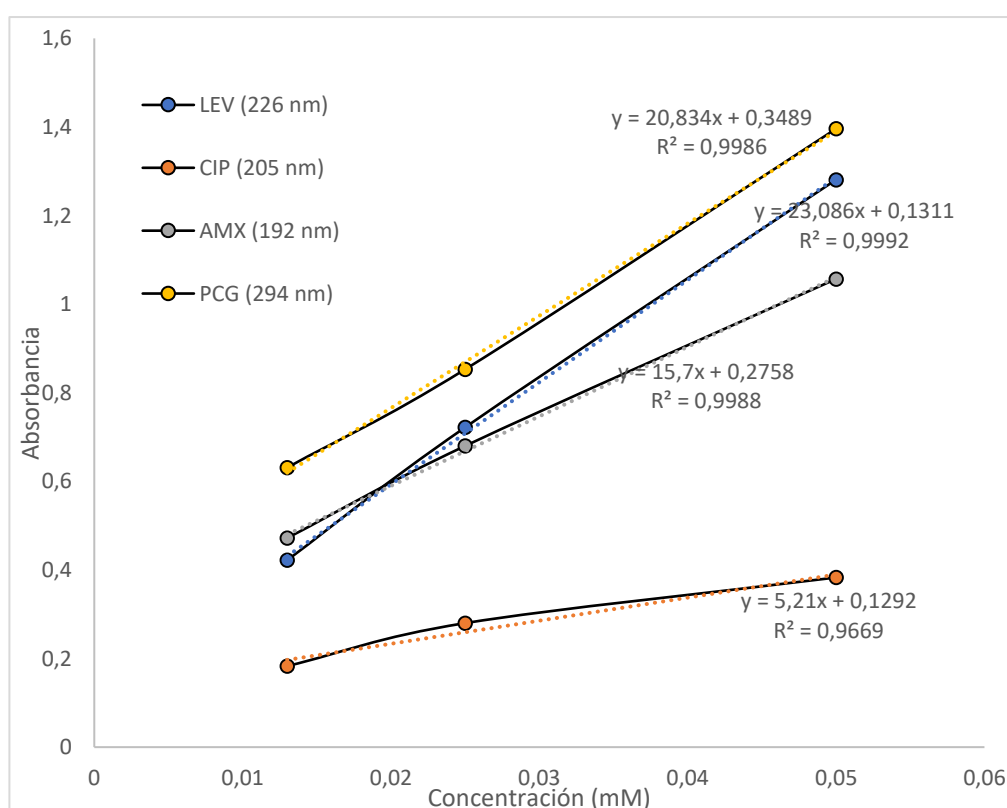


5. Barridos espectrofotométricos

Los barridos se realizaron entre 180 nm y 400 nm con un espectrofotómetro de Thermo Scientific, Genesys 20.

Con las disoluciones preparadas, tal y como se indica en el apartado “Preparación de disoluciones”, se realizan rectas de calibrado, y tras realizar los barridos espectrofotométricos, se construyen las rectas de calibrado con los valores de absorbancia de cada una de las disoluciones a la longitud de máxima absorbancia y se grafican las siguientes rectas de calibrado.

Los antibióticos que no aparecen en la gráfica 4 es porque tras realizar el barrido espectrofotométrico, se descartó la posibilidad de utilizarlos debido a que no cumplían la Ley de Beer en ese rango de concentraciones y de longitudes de onda.



Gráfica 16 Rectas de calibrado de absorbancia vs concentración de antibiótico



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ANEXO II

RESULTADOS

Autora:

Andrea Dobato Amorós

Directora:

Rosa Mosteo Abad

Codirectora:

Sindy Dayana Jojoa

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2018/2019

Índice

1. Resultados de la estandarización de métodos de control y respuesta	3
2. Resultados de la oxidación electroquímica con DSA	38
3. Resultados de la oxidación avanzada con BDD.....	44

1. Resultados de la estandarización de métodos de control y respuesta

Tabla 17 Resultados de absorbancia de los barridos espectrofotométricos a distintas concentraciones de Ciprofloxacina y Levofloxacina

	CIPROFLOXACINA			LEVOFLOXACINA		
nm	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L
200	0,186	0,257	0,383	0,406	0,650	1,178
201	0,183	0,260	0,377	0,392	0,627	1,138
202	0,180	0,262	0,372	0,380	0,607	1,102
203	0,180	0,267	0,368	0,372	0,594	1,073
204	0,180	0,271	0,365	0,365	0,582	1,050
205	0,182	0,275	0,363	0,362	0,576	1,035
206	0,180	0,278	0,357	0,357	0,567	1,016
207	0,181	0,280	0,354	0,355	0,563	1,004
208	0,181	0,281	0,351	0,353	0,560	0,998
209	0,182	0,281	0,348	0,353	0,560	0,993
210	0,182	0,280	0,344	0,353	0,559	0,991
211	0,182	0,280	0,342	0,354	0,562	0,993
212	0,183	0,279	0,341	0,356	0,565	0,997
213	0,183	0,277	0,339	0,358	0,570	1,003
214	0,183	0,273	0,335	0,360	0,576	1,014
215	0,182	0,270	0,332	0,364	0,585	1,029
216	0,182	0,268	0,330	0,368	0,596	1,048

217	0,182	0,264	0,329	0,374	0,608	1,069
218	0,181	0,259	0,325	0,381	0,624	1,100
219	0,181	0,255	0,323	0,388	0,641	1,131
220	0,180	0,251	0,322	0,395	0,658	1,162
221	0,180	0,248	0,321	0,403	0,675	1,194
222	0,180	0,247	0,321	0,409	0,690	1,221
223	0,179	0,243	0,320	0,415	0,703	1,246
224	0,179	0,241	0,319	0,419	0,713	1,264
225	0,178	0,237	0,317	0,421	0,719	1,276
226	0,178	0,233	0,315	0,422	0,722	1,281
227	0,176	0,229	0,312	0,421	0,721	1,280
228	0,175	0,225	0,309	0,418	0,717	1,274
229	0,175	0,223	0,307	0,415	0,712	1,263
230	0,174	0,220	0,305	0,410	0,703	1,246
231	0,173	0,217	0,303	0,403	0,691	1,225
232	0,172	0,215	0,302	0,395	0,677	1,201
233	0,170	0,212	0,298	0,383	0,657	1,164
234	0,171	0,212	0,299	0,378	0,647	1,145
235	0,168	0,209	0,296	0,368	0,630	1,114
236	0,166	0,206	0,293	0,357	0,610	1,081
237	0,162	0,202	0,289	0,346	0,592	1,048
238	0,160	0,200	0,287	0,336	0,575	1,018

239	0,159	0,199	0,287	0,327	0,558	0,988
240	0,161	0,201	0,289	0,322	0,547	0,965
241	0,162	0,202	0,290	0,315	0,534	0,940
242	0,162	0,203	0,291	0,311	0,525	0,923
243	0,163	0,204	0,292	0,308	0,520	0,913
244	0,163	0,204	0,294	0,305	0,515	0,906
245	0,163	0,206	0,295	0,304	0,515	0,905
246	0,164	0,208	0,298	0,303	0,515	0,906
247	0,164	0,209	0,300	0,302	0,515	0,908
248	0,165	0,211	0,303	0,301	0,514	0,906
249	0,166	0,213	0,307	0,299	0,511	0,903
250	0,166	0,214	0,310	0,297	0,509	0,900
251	0,168	0,216	0,316	0,296	0,506	0,896
252	0,170	0,219	0,324	0,295	0,506	0,897
253	0,172	0,222	0,331	0,295	0,507	0,900
254	0,174	0,227	0,340	0,296	0,509	0,904
255	0,177	0,234	0,355	0,297	0,512	0,911
256	0,182	0,242	0,369	0,298	0,514	0,915
257	0,187	0,252	0,385	0,298	0,514	0,915
258	0,192	0,262	0,402	0,296	0,509	0,906
259	0,197	0,274	0,421	0,294	0,502	0,891
260	0,202	0,285	0,437	0,290	0,493	0,874

261	0,209	0,301	0,462	0,284	0,477	0,844
262	0,215	0,317	0,485	0,278	0,464	0,818
263	0,222	0,335	0,511	0,274	0,452	0,794
264	0,230	0,353	0,536	0,272	0,446	0,781
265	0,237	0,373	0,563	0,273	0,445	0,779
266	0,245	0,391	0,586	0,275	0,447	0,785
267	0,250	0,409	0,608	0,279	0,455	0,799
268	0,256	0,427	0,627	0,284	0,466	0,821
269	0,260	0,445	0,643	0,291	0,480	0,848
270	0,263	0,461	0,656	0,299	0,497	0,883
271	0,265	0,473	0,663	0,307	0,515	0,915
272	0,265	0,485	0,666	0,314	0,532	0,952
273	0,264	0,498	0,666	0,326	0,558	1,002
274	0,261	0,504	0,660	0,335	0,579	1,045
275	0,259	0,508	0,653	0,342	0,596	1,076
276	0,254	0,511	0,641	0,350	0,617	1,119
277	0,248	0,510	0,625	0,359	0,639	1,163
278	0,239	0,507	0,600	0,370	0,667	1,220
279	0,232	0,502	0,578	0,381	0,691	1,266
280	0,232	0,503	0,561	0,398	0,721	1,316
281	0,233	0,502	0,543	0,420	0,758	1,375
282	0,232	0,497	0,524	0,437	0,788	1,425

283	0,231	0,488	0,504	0,452	0,813	1,470
284	0,226	0,472	0,477	0,468	0,844	1,518
285	0,212	0,440	0,438	0,475	0,862	1,553
286	0,201	0,410	0,404	0,481	0,875	1,575
287	0,188	0,378	0,372	0,481	0,878	1,584
288	0,180	0,350	0,347	0,481	0,877	1,579
289	0,172	0,325	0,324	0,478	0,869	1,560
290	0,164	0,300	0,304	0,471	0,853	1,529
291	0,159	0,282	0,290	0,464	0,834	1,488
292	0,156	0,268	0,279	0,455	0,812	1,443
293	0,153	0,257	0,271	0,445	0,787	1,394
294	0,149	0,245	0,262	0,431	0,755	1,326
295	0,148	0,238	0,258	0,420	0,727	1,271
296	0,146	0,230	0,253	0,403	0,688	1,197
297	0,145	0,225	0,250	0,388	0,657	1,135
298	0,144	0,222	0,248	0,374	0,627	1,076
299	0,142	0,219	0,246	0,360	0,598	1,021
300	0,141	0,215	0,245	0,341	0,562	0,957
301	0,146	0,219	0,250	0,335	0,546	0,920
302	0,145	0,217	0,251	0,323	0,524	0,881
303	0,144	0,216	0,252	0,309	0,499	0,837
304	0,145	0,216	0,253	0,297	0,478	0,801

305	0,145	0,216	0,255	0,286	0,459	0,767
306	0,145	0,216	0,258	0,274	0,439	0,734
307	0,145	0,215	0,260	0,265	0,424	0,710
308	0,145	0,214	0,263	0,256	0,410	0,688
309	0,144	0,213	0,264	0,250	0,401	0,674
310	0,145	0,213	0,267	0,246	0,394	0,665
311	0,143	0,212	0,268	0,240	0,388	0,658
312	0,144	0,213	0,270	0,238	0,386	0,654
313	0,143	0,214	0,273	0,236	0,384	0,654
314	0,143	0,214	0,274	0,235	0,384	0,655
315	0,143	0,213	0,276	0,234	0,384	0,658
316	0,142	0,212	0,278	0,234	0,385	0,662
317	0,141	0,209	0,278	0,233	0,385	0,665
318	0,141	0,207	0,279	0,232	0,388	0,671
319	0,140	0,204	0,281	0,233	0,390	0,677
320	0,139	0,201	0,281	0,233	0,391	0,682
321	0,138	0,199	0,281	0,233	0,394	0,687
322	0,138	0,195	0,279	0,234	0,397	0,694
323	0,136	0,192	0,279	0,235	0,399	0,699
324	0,136	0,191	0,277	0,235	0,402	0,704
325	0,046	0,102	0,186	0,149	0,316	0,619
326	0,044	0,101	0,185	0,147	0,316	0,626

327	0,043	0,100	0,183	0,148	0,318	0,631
328	0,044	0,100	0,182	0,149	0,323	0,637
329	0,043	0,099	0,181	0,150	0,325	0,643
330	0,050	0,107	0,187	0,163	0,335	0,653
331	0,048	0,104	0,184	0,156	0,334	0,654
332	0,048	0,100	0,182	0,155	0,332	0,655
333	0,047	0,095	0,180	0,153	0,331	0,651
334	0,046	0,089	0,175	0,151	0,325	0,643
335	0,045	0,081	0,173	0,149	0,320	0,632
336	0,043	0,079	0,167	0,147	0,317	0,625
337	0,041	0,071	0,160	0,144	0,309	0,609
338	0,037	0,066	0,149	0,138	0,302	0,593
339	0,035	0,063	0,140	0,136	0,295	0,582
340	0,030	0,060	0,125	0,132	0,287	0,566
341	0,027	0,057	0,114	0,129	0,281	0,553
342	0,024	0,054	0,102	0,127	0,274	0,539
343	0,020	0,050	0,090	0,121	0,265	0,525
344	0,017	0,048	0,076	0,116	0,257	0,508
345	0,014	0,046	0,069	0,112	0,250	0,494
346	0,012	0,042	0,061	0,107	0,241	0,479
347	0,008	0,041	0,053	0,102	0,231	0,459
348	0,006	0,039	0,047	0,097	0,221	0,443

349	0,005	0,035	0,041	0,091	0,208	0,419
350	0,002	0,033	0,036	0,084	0,194	0,387
351	0,000	0,030	0,031	0,078	0,178	0,360
352	0,000	0,028	0,027	0,069	0,160	0,326
353	-0,004	0,025	0,022	0,060	0,145	0,295
354	-0,005	0,023	0,021	0,053	0,129	0,263
355	-0,005	0,021	0,018	0,047	0,115	0,234
356	-0,005	0,018	0,014	0,039	0,099	0,203
357	-0,006	0,016	0,011	0,034	0,085	0,176
358	-0,007	0,014	0,011	0,029	0,075	0,155
359	-0,008	0,012	0,007	0,024	0,065	0,135
360	-0,010	0,010	0,005	0,021	0,057	0,119
361	-0,009	0,009	0,005	0,019	0,050	0,105
362	-0,011	0,007	0,003	0,014	0,041	0,090
363	-0,011	0,004	0,000	0,010	0,035	0,079
364	-0,011	0,003	0,000	0,009	0,032	0,072
365	-0,012	0,003	-0,001	0,008	0,029	0,064
366	-0,011	0,001	-0,003	0,005	0,024	0,055
367	-0,012	0,000	-0,003	0,003	0,021	0,050
368	-0,015	-0,001	-0,005	0,002	0,018	0,045
369	-0,012	0,000	-0,004	0,002	0,016	0,041
370	-0,011	-0,002	-0,005	0,001	0,014	0,036

371	-0,011	-0,003	-0,006	0,000	0,013	0,032
372	-0,038	-0,030	-0,030	-0,025	-0,015	0,002
373	-0,037	-0,030	-0,032	-0,027	-0,016	0,000
374	-0,038	-0,030	-0,032	-0,027	-0,019	-0,005
375	-0,036	-0,031	-0,033	-0,028	-0,020	-0,007
376	-0,038	-0,031	-0,034	-0,030	-0,022	-0,010
377	-0,038	-0,033	-0,034	-0,030	-0,024	-0,011
378	-0,039	-0,034	-0,036	-0,031	-0,026	-0,016
379	-0,037	-0,033	-0,035	-0,032	-0,026	-0,017
380	-0,037	-0,033	-0,035	-0,030	-0,027	-0,019
381	-0,037	-0,035	-0,035	-0,032	-0,027	-0,020
382	-0,038	-0,035	-0,035	-0,032	-0,027	-0,021
383	-0,037	-0,035	-0,035	-0,031	-0,028	-0,021
384	-0,038	-0,034	-0,035	-0,033	-0,029	-0,022
385	-0,037	-0,036	-0,036	-0,032	-0,030	-0,024
386	-0,038	-0,035	-0,036	-0,032	-0,029	-0,024
387	-0,037	-0,035	-0,036	-0,032	-0,030	-0,024
388	-0,038	-0,036	-0,037	-0,034	-0,030	-0,026
389	-0,037	-0,036	-0,036	-0,034	-0,031	-0,026
390	-0,037	-0,036	-0,036	-0,034	-0,032	-0,028
391	-0,040	-0,038	-0,039	-0,036	-0,035	-0,030
392	-0,041	-0,039	-0,040	-0,037	-0,035	-0,031

393	-0,040	-0,039	-0,039	-0,038	-0,035	-0,032
394	-0,040	-0,039	-0,040	-0,038	-0,035	-0,033
395	-0,040	-0,039	-0,039	-0,037	-0,035	-0,033
396	-0,041	-0,040	-0,040	-0,038	-0,037	-0,035
397	-0,041	-0,040	-0,040	-0,038	-0,037	-0,035
398	-0,042	-0,041	-0,041	-0,039	-0,039	-0,036
399	-0,041	-0,041	-0,042	-0,040	-0,038	-0,036
400	-0,041	-0,041	-0,041	-0,040	-0,038	-0,037

Tabla 18 Resultados de absorbancia de los barridos espectrofotométricos a distintas concentraciones de Tilosina y Sulfadiazina

	TILOSINA				SULFADIAZINA	
nm	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,125 mM/L	0,013 mM/L	0,05 mM/L
200	0,257	0,383	0,217	0,413	0,215	0,562
201	0,260	0,377	0,210	0,397	0,211	0,549
202	0,262	0,372	0,203	0,380	0,205	0,533
203	0,267	0,368	0,199	0,367	0,201	0,519
204	0,271	0,365	0,195	0,354	0,197	0,505
205	0,275	0,363	0,192	0,343	0,196	0,493
206	0,278	0,357	0,187	0,328	0,192	0,477
207	0,280	0,354	0,184	0,317	0,190	0,465

208	0,281	0,351	0,181	0,307	0,189	0,454
209	0,281	0,348	0,179	0,298	0,189	0,445
210	0,280	0,344	0,175	0,287	0,187	0,432
211	0,280	0,342	0,174	0,280	0,187	0,425
212	0,279	0,341	0,173	0,274	0,187	0,415
213	0,277	0,339	0,171	0,267	0,186	0,406
214	0,273	0,335	0,168	0,259	0,184	0,392
215	0,270	0,332	0,166	0,252	0,182	0,379
216	0,268	0,330	0,164	0,246	0,181	0,366
217	0,264	0,329	0,163	0,242	0,179	0,354
218	0,259	0,325	0,160	0,235	0,176	0,341
219	0,255	0,323	0,158	0,230	0,174	0,333
220	0,251	0,322	0,157	0,226	0,173	0,327
221	0,248	0,321	0,155	0,222	0,171	0,323
222	0,247	0,321	0,154	0,219	0,170	0,321
223	0,243	0,320	0,152	0,215	0,169	0,322
224	0,241	0,319	0,151	0,213	0,169	0,325
225	0,237	0,317	0,150	0,210	0,169	0,329
226	0,233	0,315	0,149	0,208	0,169	0,335
227	0,229	0,312	0,148	0,205	0,170	0,341
228	0,225	0,309	0,147	0,203	0,171	0,349
229	0,223	0,307	0,147	0,202	0,172	0,357

230	0,220	0,305	0,146	0,200	0,174	0,365
231	0,217	0,303	0,145	0,198	0,175	0,373
232	0,215	0,302	0,145	0,196	0,176	0,381
233	0,212	0,298	0,142	0,193	0,176	0,389
234	0,212	0,299	0,143	0,194	0,178	0,396
235	0,209	0,296	0,142	0,192	0,178	0,401
236	0,206	0,293	0,139	0,188	0,177	0,406
237	0,202	0,289	0,136	0,185	0,174	0,408
238	0,200	0,287	0,134	0,183	0,173	0,410
239	0,199	0,287	0,134	0,184	0,174	0,414
240	0,201	0,289	0,136	0,187	0,175	0,417
241	0,202	0,290	0,138	0,191	0,176	0,419
242	0,203	0,291	0,140	0,194	0,176	0,419
243	0,204	0,292	0,142	0,198	0,176	0,418
244	0,204	0,294	0,144	0,203	0,174	0,415
245	0,206	0,295	0,146	0,209	0,173	0,414
246	0,208	0,298	0,148	0,215	0,173	0,414
247	0,209	0,300	0,151	0,223	0,172	0,414
248	0,211	0,303	0,155	0,232	0,171	0,415
249	0,213	0,307	0,158	0,241	0,171	0,417
250	0,214	0,310	0,162	0,251	0,170	0,420
251	0,216	0,316	0,166	0,262	0,169	0,423

252	0,219	0,324	0,171	0,275	0,169	0,426
253	0,222	0,331	0,175	0,286	0,169	0,429
254	0,227	0,340	0,180	0,298	0,168	0,432
255	0,234	0,355	0,187	0,317	0,166	0,434
256	0,242	0,369	0,193	0,332	0,165	0,436
257	0,252	0,385	0,200	0,350	0,165	0,438
258	0,262	0,402	0,207	0,369	0,164	0,438
259	0,274	0,421	0,215	0,389	0,164	0,437
260	0,285	0,437	0,223	0,407	0,163	0,435
261	0,301	0,462	0,232	0,433	0,161	0,431
262	0,317	0,485	0,242	0,458	0,160	0,427
263	0,335	0,511	0,254	0,487	0,158	0,420
264	0,353	0,536	0,265	0,516	0,157	0,413
265	0,373	0,563	0,277	0,548	0,155	0,403
266	0,391	0,586	0,289	0,576	0,153	0,395
267	0,409	0,608	0,300	0,607	0,150	0,384
268	0,427	0,627	0,312	0,639	0,148	0,374
269	0,445	0,643	0,323	0,667	0,145	0,364
270	0,461	0,656	0,335	0,700	0,143	0,352
271	0,473	0,663	0,344	0,725	0,141	0,344
272	0,485	0,666	0,354	0,753	0,137	0,333
273	0,498	0,666	0,367	0,788	0,134	0,320

274	0,504	0,660	0,377	0,815	0,131	0,310
275	0,508	0,653	0,385	0,834	0,130	0,303
276	0,511	0,641	0,392	0,858	0,126	0,293
277	0,510	0,625	0,401	0,881	0,123	0,283
278	0,507	0,600	0,410	0,909	0,118	0,272
279	0,502	0,578	0,420	0,933	0,117	0,265
280	0,503	0,561	0,434	0,961	0,122	0,265
281	0,502	0,543	0,453	0,994	0,131	0,267
282	0,497	0,524	0,469	1,022	0,137	0,269
283	0,488	0,504	0,481	1,045	0,142	0,269
284	0,472	0,477	0,494	1,069	0,146	0,267
285	0,440	0,438	0,499	1,086	0,141	0,256
286	0,410	0,404	0,503	1,100	0,138	0,247
287	0,378	0,372	0,504	1,106	0,133	0,238
288	0,350	0,347	0,505	1,110	0,131	0,230
289	0,325	0,324	0,505	1,111	0,129	0,222
290	0,300	0,304	0,503	1,110	0,127	0,215
291	0,282	0,290	0,501	1,105	0,125	0,209
292	0,268	0,279	0,498	1,098	0,123	0,204
293	0,257	0,271	0,494	1,090	0,122	0,199
294	0,245	0,262	0,488	1,075	0,120	0,193
295	0,238	0,258	0,483	1,062	0,119	0,188

296	0,230	0,253	0,475	1,043	0,117	0,182
297	0,225	0,250	0,468	1,025	0,117	0,178
298	0,222	0,248	0,460	1,005	0,115	0,173
299	0,219	0,246	0,450	0,983	0,114	0,168
300	0,215	0,245	0,438	0,954	0,112	0,162
301	0,219	0,250	0,434	0,936	0,115	0,164
302	0,217	0,251	0,424	0,913	0,114	0,160
303	0,216	0,252	0,411	0,881	0,112	0,155
304	0,216	0,253	0,398	0,850	0,112	0,152
305	0,216	0,255	0,386	0,816	0,111	0,148
306	0,216	0,258	0,367	0,775	0,109	0,143
307	0,215	0,260	0,352	0,737	0,107	0,139
308	0,214	0,263	0,332	0,689	0,105	0,134
309	0,213	0,264	0,315	0,649	0,103	0,130
310	0,213	0,267	0,299	0,611	0,102	0,127
311	0,212	0,268	0,278	0,561	0,100	0,122
312	0,213	0,270	0,262	0,524	0,098	0,118
313	0,214	0,273	0,248	0,487	0,097	0,116
314	0,214	0,274	0,235	0,456	0,096	0,113
315	0,213	0,276	0,220	0,423	0,093	0,109
316	0,212	0,278	0,207	0,393	0,092	0,107
317	0,209	0,278	0,197	0,368	0,091	0,105

318	0,207	0,279	0,184	0,337	0,089	0,102
319	0,204	0,281	0,172	0,314	0,088	0,101
320	0,201	0,281	0,163	0,292	0,088	0,099
321	0,199	0,281	0,156	0,274	0,085	0,097
322	0,195	0,279	0,146	0,250	0,085	0,095
323	0,192	0,279	0,139	0,235	0,084	0,092
324	0,191	0,277	0,132	0,218	0,083	0,092
325	0,102	0,186	0,039	0,115	-0,007	-0,017
326	0,101	0,185	0,034	0,103	-0,007	-0,018
327	0,100	0,183	0,025	0,087	-0,010	-0,019
328	0,100	0,182	0,023	0,077	-0,009	-0,021
329	0,099	0,181	0,017	0,067	-0,003	-0,022
330	0,107	0,187	0,023	0,064	-0,004	-0,021
331	0,104	0,184	0,016	0,055	-0,005	-0,023
332	0,100	0,182	0,013	0,048	-0,005	-0,023
333	0,095	0,180	0,011	0,041	-0,003	-0,024
334	0,089	0,175	0,007	0,034	-0,006	-0,024
335	0,081	0,173	0,005	0,031	-0,004	-0,025
336	0,079	0,167	0,005	0,027	-0,004	-0,024
337	0,071	0,160	0,003	0,024	-0,005	-0,024
338	0,066	0,149	0,002	0,019	-0,007	-0,025
339	0,063	0,140	0,001	0,017	-0,005	-0,025

340	0,060	0,125	-0,001	0,015	-0,005	0,001
341	0,057	0,114	-0,001	0,013	-0,003	0,001
342	0,054	0,102	-0,001	0,011	-0,004	0,002
343	0,050	0,090	-0,005	0,008	-0,005	-0,001
344	0,048	0,076	-0,005	0,005	-0,006	-0,002
345	0,046	0,069	-0,005	0,006	-0,004	-0,002
346	0,042	0,061	-0,005	0,003	-0,006	-0,002
347	0,041	0,053	-0,007	0,003	-0,006	-0,004
348	0,039	0,047	-0,007	0,001	-0,006	-0,005
349	0,035	0,041	-0,010	-0,001	-0,008	-0,007
350	0,033	0,036	-0,009	-0,001	-0,007	-0,007
351	0,030	0,031	-0,008	-0,002	-0,008	-0,006
352	0,028	0,027	-0,010	-0,004	-0,008	-0,008
353	0,025	0,022	-0,011	-0,005	-0,009	-0,008
354	0,023	0,021	-0,011	-0,006	-0,008	-0,009
355	0,021	0,018	-0,011	-0,006	-0,008	-0,007
356	0,018	0,014	-0,012	-0,007	-0,009	-0,009
357	0,016	0,011	-0,012	-0,007	-0,010	-0,009
358	0,014	0,011	-0,012	-0,008	-0,009	-0,009
359	0,012	0,007	-0,013	-0,009	-0,010	-0,010
360	0,010	0,005	-0,013	-0,009	-0,009	-0,010
361	0,009	0,005	-0,015	-0,010	-0,011	-0,011

362	0,007	0,003	-0,014	-0,011	-0,010	-0,011
363	0,004	0,000	-0,014	-0,011	-0,011	-0,011
364	0,003	0,000	-0,015	-0,012	-0,012	-0,012
365	0,003	-0,001	-0,015	-0,014	-0,012	-0,011
366	0,001	-0,003	-0,014	-0,012	-0,012	-0,011
367	0,000	-0,003	-0,015	-0,012	-0,012	-0,012
368	-0,001	-0,005	-0,014	-0,013	-0,012	-0,013
369	0,000	-0,004	-0,015	-0,011	-0,012	-0,012
370	-0,002	-0,005	-0,014	-0,012	-0,011	-0,011
371	-0,003	-0,006	-0,013	-0,011	-0,009	-0,010
372	-0,030	-0,030	-0,039	-0,038	-0,036	-0,038
373	-0,030	-0,032	-0,039	-0,037	-0,036	-0,038
374	-0,030	-0,032	-0,039	-0,038	-0,036	-0,038
375	-0,031	-0,033	-0,039	-0,038	-0,037	-0,036
376	-0,031	-0,034	-0,039	-0,037	-0,037	-0,036
377	-0,033	-0,034	-0,040	-0,038	-0,037	-0,038
378	-0,034	-0,036	-0,040	-0,039	-0,037	-0,037
379	-0,033	-0,035	-0,040	-0,038	-0,037	-0,037
380	-0,033	-0,035	-0,039	-0,038	-0,037	-0,038
381	-0,035	-0,035	-0,040	-0,038	-0,037	-0,037
382	-0,035	-0,035	-0,037	-0,038	-0,036	-0,037
383	-0,035	-0,035	-0,038	-0,037	-0,036	-0,037

384	-0,034	-0,035	-0,038	-0,038	-0,037	-0,037
385	-0,036	-0,036	-0,038	-0,037	-0,036	-0,037
386	-0,035	-0,036	-0,038	-0,038	-0,036	-0,038
387	-0,035	-0,036	-0,038	-0,037	-0,036	-0,036
388	-0,036	-0,037	-0,038	-0,037	-0,037	-0,038
389	-0,036	-0,036	-0,039	-0,038	-0,036	-0,037
390	-0,036	-0,036	-0,038	-0,037	-0,035	-0,036
391	-0,038	-0,039	-0,040	-0,040	-0,038	-0,040
392	-0,039	-0,040	-0,041	-0,040	-0,039	-0,040
393	-0,039	-0,039	-0,040	-0,039	-0,038	-0,040
394	-0,039	-0,040	-0,041	-0,039	-0,039	-0,040
395	-0,039	-0,039	-0,041	-0,039	-0,039	-0,040
396	-0,040	-0,040	-0,041	-0,041	-0,040	-0,041
397	-0,040	-0,040	-0,042	-0,041	-0,040	-0,041
398	-0,041	-0,041	-0,042	-0,041	-0,041	-0,041
399	-0,041	-0,042	-0,042	-0,041	-0,041	-0,041
400	-0,041	-0,041	-0,041	-0,041	-0,041	-0,041

Tabla 19 Resultados de absorbancia de los barridos espectrofotométricos a distintas concentraciones de Azitromicina y Sulfametoxazol

	AZITROMICINA					SULFAMETOXAZOL			
nm	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,125 mM/L	0,25 mM/L	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,25 mM/L

190	0,297	0,280	0,280	0,298	0,288	0,350	0,350	0,400	1,032
191	0,216	0,197	0,201	0,218	0,205	0,271	0,271	0,322	0,984
192	0,184	0,169	0,169	0,185	0,174	0,237	0,241	0,295	0,978
193	0,149	0,134	0,134	0,149	0,136	0,203	0,210	0,263	0,964
194	0,139	0,126	0,126	0,140	0,129	0,192	0,201	0,257	0,980
195	0,124	0,112	0,112	0,126	0,115	0,178	0,188	0,246	0,982
196	0,113	0,102	0,103	0,115	0,105	0,167	0,179	0,238	0,984
197	0,107	0,098	0,098	0,110	0,099	0,162	0,175	0,234	0,981
198	0,104	0,095	0,095	0,107	0,096	0,157	0,172	0,230	0,973
199	0,098	0,090	0,091	0,100	0,091	0,149	0,166	0,223	0,953
200	0,096	0,088	0,089	0,098	0,090	0,146	0,164	0,220	0,937
201	0,094	0,087	0,088	0,097	0,089	0,142	0,161	0,216	0,914
202	0,093	0,087	0,088	0,096	0,088	0,139	0,159	0,212	0,888
203	0,094	0,088	0,089	0,097	0,089	0,139	0,158	0,209	0,867
204	0,095	0,090	0,091	0,098	0,091	0,139	0,157	0,208	0,848
205	0,098	0,093	0,094	0,100	0,093	0,140	0,158	0,208	0,836
206	0,098	0,094	0,094	0,101	0,094	0,139	0,156	0,205	0,821
207	0,101	0,096	0,097	0,104	0,097	0,140	0,157	0,205	0,813
208	0,102	0,098	0,099	0,105	0,099	0,140	0,157	0,205	0,806
209	0,103	0,100	0,101	0,107	0,100	0,141	0,157	0,205	0,801
210	0,105	0,101	0,102	0,108	0,102	0,141	0,155	0,204	0,793
211	0,106	0,103	0,104	0,110	0,103	0,141	0,155	0,203	0,786

212	0,108	0,105	0,106	0,112	0,106	0,142	0,155	0,203	0,777
213	0,109	0,106	0,107	0,113	0,107	0,141	0,154	0,201	0,766
214	0,110	0,106	0,107	0,113	0,108	0,140	0,151	0,197	0,747
215	0,111	0,107	0,108	0,114	0,108	0,139	0,149	0,194	0,723
216	0,111	0,108	0,109	0,115	0,109	0,138	0,146	0,190	0,696
217	0,112	0,109	0,110	0,115	0,110	0,137	0,145	0,186	0,668
218	0,112	0,109	0,110	0,115	0,110	0,135	0,141	0,180	0,626
219	0,112	0,109	0,110	0,115	0,110	0,133	0,139	0,175	0,589
220	0,112	0,109	0,110	0,115	0,110	0,132	0,138	0,171	0,553
221	0,112	0,109	0,110	0,114	0,110	0,131	0,136	0,166	0,513
222	0,112	0,110	0,110	0,114	0,111	0,130	0,135	0,162	0,480
223	0,112	0,109	0,110	0,114	0,110	0,129	0,134	0,158	0,444
224	0,112	0,109	0,110	0,114	0,110	0,128	0,133	0,155	0,418
225	0,111	0,109	0,110	0,114	0,110	0,127	0,132	0,152	0,395
226	0,112	0,109	0,110	0,114	0,110	0,127	0,132	0,150	0,378
227	0,111	0,109	0,110	0,113	0,110	0,126	0,132	0,148	0,362
228	0,111	0,109	0,110	0,113	0,109	0,125	0,131	0,147	0,348
229	0,111	0,109	0,110	0,113	0,110	0,125	0,132	0,146	0,338
230	0,112	0,109	0,110	0,113	0,110	0,125	0,132	0,145	0,328
231	0,111	0,109	0,110	0,113	0,110	0,124	0,132	0,144	0,318
232	0,111	0,109	0,110	0,112	0,110	0,124	0,132	0,143	0,311
233	0,109	0,107	0,108	0,111	0,108	0,122	0,131	0,141	0,300

234	0,111	0,108	0,109	0,112	0,109	0,123	0,132	0,142	0,297
235	0,109	0,107	0,108	0,110	0,108	0,121	0,130	0,140	0,291
236	0,106	0,104	0,105	0,107	0,105	0,119	0,128	0,138	0,285
237	0,103	0,101	0,102	0,104	0,102	0,116	0,126	0,135	0,281
238	0,101	0,099	0,100	0,102	0,100	0,114	0,124	0,133	0,279
239	0,101	0,099	0,100	0,102	0,100	0,114	0,125	0,134	0,282
240	0,102	0,101	0,101	0,103	0,101	0,116	0,127	0,136	0,290
241	0,103	0,101	0,102	0,104	0,102	0,117	0,129	0,138	0,299
242	0,103	0,102	0,103	0,104	0,102	0,118	0,130	0,140	0,310
243	0,104	0,102	0,103	0,104	0,102	0,118	0,131	0,142	0,322
244	0,103	0,102	0,102	0,104	0,102	0,118	0,132	0,144	0,339
245	0,103	0,101	0,102	0,104	0,102	0,119	0,133	0,147	0,354
246	0,103	0,101	0,102	0,104	0,102	0,120	0,134	0,148	0,369
247	0,102	0,101	0,102	0,103	0,101	0,120	0,135	0,151	0,388
248	0,102	0,101	0,102	0,103	0,101	0,120	0,136	0,153	0,407
249	0,102	0,101	0,101	0,103	0,101	0,121	0,137	0,156	0,426
250	0,102	0,100	0,101	0,102	0,100	0,121	0,137	0,158	0,444
251	0,101	0,099	0,100	0,102	0,100	0,121	0,138	0,160	0,466
252	0,100	0,099	0,100	0,101	0,099	0,121	0,138	0,163	0,486
253	0,101	0,099	0,100	0,101	0,099	0,122	0,139	0,164	0,502
254	0,100	0,098	0,099	0,101	0,099	0,121	0,139	0,166	0,518
255	0,099	0,097	0,098	0,099	0,097	0,120	0,139	0,167	0,541

256	0,099	0,097	0,098	0,099	0,097	0,121	0,139	0,169	0,557
257	0,099	0,097	0,097	0,099	0,097	0,121	0,139	0,171	0,573
258	0,098	0,097	0,097	0,099	0,097	0,121	0,139	0,172	0,589
259	0,098	0,096	0,097	0,099	0,096	0,120	0,139	0,173	0,603
260	0,098	0,096	0,097	0,099	0,096	0,120	0,138	0,174	0,614
261	0,096	0,094	0,095	0,097	0,094	0,119	0,137	0,174	0,627
262	0,095	0,093	0,094	0,096	0,094	0,118	0,135	0,174	0,636
263	0,095	0,093	0,094	0,096	0,093	0,117	0,134	0,173	0,642
264	0,094	0,093	0,093	0,094	0,093	0,115	0,132	0,172	0,646
265	0,094	0,092	0,092	0,094	0,092	0,114	0,130	0,171	0,647
266	0,092	0,091	0,091	0,093	0,092	0,113	0,129	0,169	0,645
267	0,091	0,089	0,090	0,092	0,090	0,111	0,126	0,167	0,640
268	0,090	0,089	0,089	0,091	0,089	0,109	0,123	0,164	0,633
269	0,089	0,088	0,088	0,090	0,089	0,107	0,121	0,161	0,624
270	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,105	0,117	0,158	0,613
271	0,087	0,086	0,086	0,088	0,087	0,104	0,116	0,155	0,602
272	0,085	0,083	0,084	0,085	0,084	0,101	0,112	0,151	0,588
273	0,083	0,082	0,083	0,083	0,082	0,098	0,109	0,147	0,570
274	0,082	0,081	0,081	0,083	0,081	0,097	0,106	0,143	0,555
275	0,080	0,080	0,080	0,081	0,080	0,095	0,104	0,140	0,544
276	0,079	0,077	0,078	0,079	0,078	0,092	0,101	0,136	0,528
277	0,077	0,075	0,076	0,077	0,075	0,089	0,098	0,131	0,511

278	0,074	0,072	0,073	0,074	0,074	0,086	0,093	0,127	0,490
279	0,074	0,073	0,073	0,074	0,073	0,085	0,092	0,124	0,474
280	0,080	0,078	0,079	0,080	0,079	0,091	0,097	0,129	0,465
281	0,090	0,089	0,089	0,090	0,089	0,100	0,106	0,136	0,458
282	0,098	0,096	0,097	0,097	0,097	0,107	0,113	0,141	0,451
283	0,103	0,102	0,102	0,103	0,102	0,112	0,117	0,145	0,441
284	0,108	0,107	0,108	0,108	0,108	0,117	0,122	0,148	0,427
285	0,106	0,104	0,105	0,106	0,105	0,114	0,118	0,142	0,403
286	0,104	0,103	0,103	0,104	0,103	0,111	0,115	0,138	0,382
287	0,101	0,100	0,100	0,101	0,100	0,108	0,111	0,133	0,359
288	0,099	0,098	0,099	0,099	0,099	0,106	0,109	0,129	0,340
289	0,098	0,097	0,097	0,098	0,097	0,104	0,107	0,125	0,321
290	0,098	0,096	0,097	0,097	0,097	0,103	0,105	0,122	0,301
291	0,097	0,096	0,096	0,096	0,096	0,101	0,104	0,119	0,286
292	0,096	0,095	0,096	0,096	0,096	0,101	0,102	0,117	0,271
293	0,096	0,095	0,096	0,096	0,095	0,100	0,102	0,115	0,257
294	0,095	0,094	0,094	0,095	0,095	0,099	0,100	0,112	0,241
295	0,095	0,095	0,095	0,096	0,095	0,099	0,100	0,111	0,229
296	0,095	0,094	0,094	0,095	0,094	0,097	0,099	0,109	0,214
297	0,095	0,093	0,094	0,095	0,094	0,097	0,099	0,107	0,202
298	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,096	0,098	0,105	0,191
299	0,093	0,092	0,093	0,093	0,093	0,095	0,097	0,103	0,181

300	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,094	0,095	0,101	0,167
301	0,096	0,095	0,095	0,096	0,096	0,097	0,098	0,104	0,165
302	0,095	0,095	0,095	0,096	0,096	0,097	0,098	0,103	0,157
303	0,095	0,094	0,094	0,095	0,094	0,095	0,096	0,101	0,147
304	0,095	0,094	0,094	0,094	0,094	0,096	0,097	0,100	0,141
305	0,095	0,093	0,094	0,094	0,094	0,095	0,095	0,099	0,133
306	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,094	0,094	0,097	0,125
307	0,092	0,092	0,092	0,093	0,092	0,093	0,093	0,096	0,118
308	0,090	0,090	0,091	0,091	0,090	0,091	0,091	0,093	0,111
309	0,090	0,090	0,089	0,090	0,090	0,090	0,090	0,091	0,106
310	0,088	0,089	0,088	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,102
311	0,087	0,086	0,087	0,086	0,086	0,087	0,087	0,087	0,097
312	0,085	0,084	0,085	0,085	0,085	0,086	0,085	0,086	0,093
313	0,085	0,084	0,085	0,084	0,084	0,084	0,085	0,084	0,090
314	0,084	0,083	0,083	0,084	0,083	0,083	0,083	0,083	0,088
315	0,082	0,081	0,081	0,081	0,081	0,082	0,082	0,081	0,085
316	0,081	0,080	0,081	0,080	0,080	0,081	0,080	0,080	0,082
317	0,079	0,078	0,078	0,080	0,080	0,079	0,078	0,079	0,081
318	0,079	0,077	0,078	0,078	0,078	0,077	0,077	0,077	0,080
319	0,077	0,076	0,077	0,076	0,077	0,076	0,076	0,076	0,078
320	0,076	0,075	0,075	0,075	0,076	0,076	0,076	0,076	0,076
321	0,076	0,074	0,074	0,074	0,074	0,074	0,074	0,074	0,076

322	0,074	0,073	0,074	0,073	0,074	0,074	0,072	0,073	0,075
323	0,072	0,073	0,072	0,072	0,073	0,073	0,072	0,072	0,073
324	0,072	0,072	0,072	0,073	0,073	0,073	0,072	0,072	0,072
325	-0,037	-0,037	-0,037	-0,038	-0,038	-0,038	-0,037	-0,038	-0,037

Tabla 20 Resultados de absorbancia de los barridos espectrofotométricos a distintas concentraciones de Penicilina G y Amoxicilina

	PENICILINA G					AMOXICILINA				
nm	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,125 mM/L	0,25 mM/L	0,013 mM/L	0,025 mM/L	0,05 mM/L	0,125 mM/L	0,25 mM/L
190	0,631	0,853	1,396	2,375	2,609	0,472	0,680	1,057	2,390	2,742
191	0,522	0,729	1,241	2,304	2,679	0,395	0,606	1,001	2,409	2,802
192	0,474	0,657	1,137	2,209	2,731	0,367	0,582	0,984	2,447	2,844
193	0,407	0,574	0,993	2,021	2,739	0,332	0,550	0,957	2,435	2,893
194	0,367	0,511	0,867	1,784	2,711	0,323	0,541	0,953	2,434	2,904
195	0,328	0,450	0,759	1,565	2,564	0,305	0,520	0,928	2,408	2,970
196	0,291	0,391	0,652	1,336	2,315	0,289	0,495	0,889	2,345	2,971
197	0,270	0,358	0,592	1,201	2,121	0,274	0,469	0,843	2,257	2,959
198	0,255	0,335	0,550	1,105	1,969	0,258	0,440	0,787	2,139	2,920
199	0,239	0,312	0,511	1,020	1,831	0,234	0,396	0,702	1,946	2,802
200	0,233	0,302	0,491	0,978	1,756	0,220	0,366	0,644	1,808	2,668
201	0,225	0,292	0,473	0,938	1,686	0,204	0,332	0,577	1,647	2,457
202	0,219	0,283	0,456	0,901	1,617	0,189	0,301	0,515	1,491	2,216

203	0,215	0,276	0,444	0,872	1,562	0,179	0,279	0,468	1,366	2,012
204	0,212	0,271	0,433	0,847	1,512	0,171	0,260	0,430	1,263	1,832
205	0,210	0,267	0,424	0,826	1,470	0,167	0,249	0,406	1,189	1,697
206	0,206	0,261	0,412	0,798	1,415	0,162	0,235	0,378	1,107	1,570
207	0,205	0,257	0,402	0,775	1,367	0,160	0,228	0,360	1,044	1,471
208	0,202	0,253	0,392	0,750	1,316	0,157	0,221	0,345	0,993	1,393
209	0,200	0,249	0,383	0,728	1,272	0,157	0,217	0,334	0,951	1,330
210	0,197	0,242	0,368	0,693	1,203	0,154	0,211	0,320	0,897	1,253
211	0,195	0,239	0,359	0,671	1,156	0,154	0,208	0,313	0,867	1,207
212	0,194	0,234	0,348	0,643	1,103	0,154	0,206	0,306	0,833	1,159
213	0,190	0,229	0,336	0,614	1,043	0,154	0,203	0,299	0,803	1,120
214	0,186	0,221	0,319	0,574	0,969	0,152	0,199	0,290	0,766	1,073
215	0,182	0,213	0,303	0,536	0,895	0,151	0,196	0,284	0,735	1,034
216	0,178	0,207	0,289	0,502	0,830	0,151	0,194	0,278	0,708	1,002
217	0,174	0,201	0,277	0,472	0,773	0,150	0,192	0,275	0,686	0,977
218	0,169	0,192	0,260	0,434	0,704	0,149	0,190	0,271	0,661	0,954
219	0,165	0,185	0,246	0,400	0,643	0,149	0,189	0,269	0,644	0,943
220	0,161	0,179	0,235	0,371	0,593	0,149	0,189	0,269	0,632	0,940
221	0,158	0,173	0,223	0,345	0,547	0,149	0,189	0,270	0,622	0,942
222	0,156	0,170	0,216	0,326	0,516	0,150	0,190	0,271	0,615	0,947
223	0,153	0,165	0,209	0,309	0,487	0,150	0,191	0,273	0,609	0,955
224	0,151	0,163	0,204	0,297	0,467	0,150	0,192	0,275	0,604	0,962

225	0,149	0,160	0,198	0,286	0,448	0,151	0,192	0,276	0,598	0,967
226	0,148	0,158	0,194	0,278	0,434	0,151	0,193	0,277	0,592	0,969
227	0,146	0,156	0,191	0,270	0,420	0,151	0,192	0,277	0,584	0,966
228	0,145	0,154	0,187	0,263	0,409	0,150	0,192	0,276	0,573	0,959
229	0,144	0,153	0,185	0,258	0,400	0,150	0,191	0,275	0,563	0,949
230	0,143	0,151	0,183	0,254	0,393	0,150	0,190	0,272	0,550	0,932
231	0,142	0,150	0,181	0,250	0,386	0,149	0,188	0,268	0,535	0,909
232	0,140	0,149	0,179	0,247	0,381	0,147	0,185	0,262	0,517	0,882
233	0,137	0,146	0,175	0,242	0,373	0,144	0,179	0,253	0,492	0,838
234	0,138	0,146	0,175	0,242	0,372	0,144	0,178	0,249	0,478	0,812
235	0,135	0,144	0,172	0,238	0,367	0,140	0,172	0,239	0,455	0,771
236	0,132	0,140	0,169	0,234	0,361	0,136	0,165	0,227	0,428	0,721
237	0,128	0,136	0,164	0,229	0,356	0,130	0,158	0,215	0,402	0,671
238	0,125	0,134	0,161	0,226	0,351	0,126	0,151	0,203	0,377	0,622
239	0,124	0,133	0,160	0,224	0,348	0,123	0,145	0,192	0,353	0,571
240	0,126	0,134	0,161	0,224	0,347	0,123	0,143	0,185	0,334	0,530
241	0,126	0,134	0,161	0,223	0,344	0,121	0,139	0,175	0,312	0,481
242	0,126	0,134	0,160	0,221	0,341	0,119	0,135	0,168	0,294	0,444
243	0,125	0,134	0,159	0,219	0,337	0,118	0,132	0,161	0,280	0,412
244	0,124	0,132	0,157	0,216	0,331	0,116	0,128	0,154	0,262	0,378
245	0,124	0,131	0,156	0,213	0,325	0,115	0,125	0,149	0,251	0,354
246	0,124	0,131	0,155	0,211	0,320	0,114	0,124	0,146	0,243	0,337

247	0,122	0,130	0,153	0,206	0,312	0,113	0,122	0,142	0,233	0,320
248	0,122	0,129	0,151	0,202	0,304	0,112	0,120	0,139	0,226	0,307
249	0,121	0,128	0,149	0,198	0,296	0,111	0,119	0,137	0,221	0,297
250	0,120	0,127	0,147	0,195	0,290	0,110	0,118	0,135	0,216	0,289
251						0,109	0,116	0,133	0,212	0,282
252						0,109	0,115	0,132	0,209	0,277
253						0,109	0,115	0,131	0,207	0,274
254						0,108	0,115	0,130	0,205	0,272
255						0,106	0,113	0,128	0,202	0,269
256						0,107	0,112	0,129	0,201	0,269
257						0,106	0,113	0,128	0,200	0,269
258						0,106	0,113	0,128	0,200	0,269
259						0,106	0,113	0,128	0,200	0,270
260						0,105	0,112	0,128	0,200	0,272
261						0,104	0,111	0,127	0,200	0,273
262						0,103	0,111	0,127	0,200	0,276
263						0,103	0,110	0,127	0,201	0,280
264						0,103	0,110	0,128	0,202	0,283
265						0,102	0,110	0,128	0,204	0,288
266						0,102	0,109	0,128	0,204	0,292
267						0,100	0,109	0,128	0,206	0,295
268						0,099	0,108	0,128	0,207	0,299

269						0,099	0,107	0,127	0,208	0,303
270						0,097	0,107	0,127	0,209	0,307
271						0,097	0,107	0,127	0,210	0,310
272						0,095	0,105	0,126	0,209	0,312
273						0,094	0,104	0,125	0,209	0,313
274						0,093	0,102	0,123	0,208	0,311
275						0,091	0,101	0,122	0,207	0,310
276						0,090	0,099	0,120	0,204	0,306
277						0,087	0,097	0,118	0,201	0,303
278						0,084	0,094	0,115	0,197	0,299
279						0,084	0,094	0,114	0,196	0,299
280						0,091	0,100	0,120	0,202	0,304
281						0,100	0,109	0,129	0,210	0,310
282						0,107	0,116	0,136	0,215	0,311
283						0,112	0,121	0,140	0,217	0,309
284						0,117	0,126	0,143	0,216	0,303
285						0,113	0,122	0,138	0,207	0,287
286						0,111	0,119	0,135	0,200	0,274
287						0,108	0,115	0,129	0,192	0,263
288						0,107	0,114	0,128	0,188	0,256
289						0,105	0,112	0,125	0,183	0,250
290						0,104	0,110	0,123	0,180	0,245

291						0,103	0,109	0,123	0,178	0,241
292						0,103	0,109	0,122	0,176	0,238
293						0,103	0,109	0,121	0,174	0,236
294						0,101	0,107	0,119	0,172	0,232
295						0,102	0,107	0,119	0,171	0,229
296						0,101	0,107	0,118	0,168	0,226
297						0,101	0,107	0,117	0,167	0,223
298						0,100	0,106	0,117	0,165	0,220
299						0,100	0,104	0,116	0,164	0,217
300						0,098	0,102	0,114	0,161	0,213
301						0,102	0,106	0,117	0,163	0,214
302						0,101	0,106	0,117	0,162	0,213
303						0,101	0,104	0,116	0,160	0,209
304						0,101	0,105	0,115	0,158	0,207
305						0,100	0,104	0,115	0,157	0,205
306						0,099	0,104	0,114	0,154	0,201
307						0,099	0,102	0,112	0,152	0,198
308						0,097	0,100	0,110	0,150	0,194
309						0,095	0,099	0,108	0,148	0,192
310						0,095	0,098	0,108	0,146	0,191
311						0,092	0,095	0,105	0,143	0,186
312						0,092	0,095	0,104	0,143	0,186

313						0,090	0,094	0,103	0,140	0,184
314						0,089	0,092	0,102	0,140	0,182
315						0,088	0,091	0,100	0,137	0,180
316						0,086	0,089	0,099	0,136	0,178
317						0,085	0,088	0,097	0,134	0,177
318						0,084	0,087	0,096	0,133	0,175
319						0,083	0,086	0,096	0,132	0,174
320						0,084	0,084	0,095	0,132	0,173
321						0,081	0,084	0,093	0,130	0,172
322						0,080	0,082	0,092	0,129	0,172
323						0,079	0,082	0,091	0,127	0,171
324						0,079	0,082	0,091	0,128	0,171
325						-0,031	-0,027	-0,018	0,020	0,062

Tabla 21 Datos para la realización de la recta de calibrado a partir de los datos espectrofotométricos con la longitud de onda de máxima absorbancia y las absorbancias medidas a dicha longitud para cada concentración de antibiótico

LEVOFLOXACINA	226 nm
----------------------	---------------

Concentración (mmol/L)	Absorbancia
0,013	0,422
0,025	0,722
0,05	1,281

CIPROFLOXACINA	200-210 nm
-----------------------	-------------------

Concentración (mmol/L)	Absorbancia
0,013	0,183
0,025	0,28
0,05	0,383

AMOXICILINA	190-195 nm
--------------------	-------------------

Concentración (mmol/L)	Absorbancia
0,013	0,472
0,025	0,68
0,05	1,057
0,125	2,447
0,25	2,97

PENICILINA G	190-196 nm
---------------------	-------------------

Concentración (mmol/L)	Absorbancia
0,013	0,631
0,025	0,853
0,05	1,396
0,125	2,375
0,25	2,739

Tabla 22 Resultados de la actividad antibiótica con *S. Aureus* en las condiciones óptimas seleccionadas de Apramicina y Penicilina G

S. Aureus	Apramicina				Penicilina G			
Concentración (mmol/L)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,013	12,0	15,0	13,5	2,1	24,0	26,0	25,0	1,4
0,025	17,0	17,0	17,0	0,0	26,0	29,0	27,5	2,1
0,04	18,0	19,0	18,5	0,7	27,0	33,0	30,0	4,2
0,08	18,0	19,0	18,5	0,7	30,0	29,0	29,5	0,7
0,125	20,0	21,0	20,5	0,7	30,0	34,0	32,0	2,8

Tabla 23 Resultados de la actividad antibiótica con *S. Aureus* en las condiciones óptimas seleccionadas de Amoxicilina, Ciprofloxacina y Levofloxacina

S. Aureus	Amoxicilina				Ciprofloxacina				Levofloxacina			
Concentración (mmol/L)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,013	6,0	8,0	7,0	1,4	12,0	13,0	12,5	0,7	12,0	13,0	12,5	0,7
0,025	10,0	11,0	10,5	0,7	24,0	25,0	24,5	0,7	24,0	25,0	24,5	0,7
0,04	13,0	13,0	13,0	0,0	29,0	30,0	29,5	0,7	29,0	30,0	29,5	0,7
0,08	14,0	14,0	14,0	0,0	30,0	31,0	30,5	0,7	30,0	31,0	30,5	0,7
0,125	16,0	16,0	16,0	0,0	31,0	33,0	32,0	1,4	31,0	33,0	32,0	1,4

Tabla 24 Resultados de la actividad antibiótica con E-Coli en las condiciones óptimas seleccionadas de Apramicina y Amoxicilina

E-coli	Apramicina				Amoxicilina			
Concentración (mmol/L)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,013	7,0	7,0	7,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0
0,025	8,0	11,0	9,5	2,1	23,0	24,0	23,5	0,7
0,04	10,0	12,0	11,0	1,4	25,0	28,0	26,5	2,1
0,08	16,0	15,0	15,5	0,7	27,0	27,0	27,0	0,0
0,125	17,0	19,0	18,0	1,4	30,0	30,0	30,0	0,0

Tabla 25 Resultados de la actividad antibiótica con E-Coli en las condiciones óptimas seleccionadas de Ciprofloxacina y Levofloxacina

E-coli	Ciprofloxacina				Levofloxacina			
Concentración (mmol/L)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,013	8,0	12,0	10,0	2,8	10,0	12,0	11,0	1,4
0,025	13,0	15,0	14,0	1,4	22,0	21,0	21,5	0,7
0,04	22,0	20,0	21,0	1,4	36,0	32,0	34,0	2,8
0,08	33,0	34,0	33,5	0,7	36,0	34,0	35,0	1,4
0,125	35,0	36,0	35,5	0,7	37,0	36,0	36,5	0,7

2. Resultados de la oxidación electroquímica con DSA

Tabla 26 Resultados de HPLC con el tratamiento de oxidación electroquímica con DSA para cada antibiótico en distintos tiempos, calculándose la concentración con las rectas de calibrado correspondientes

AMOXICILINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1032	1,0000	0,1080	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,0976	0,9457	0,0985	0,9120	0,9289	0,0238
10	0,0856	0,8298	0,0808	0,7481	0,7890	0,0578
20	0,0694	0,6729	0,0703	0,6505	0,6617	0,0158
30	0,0602	0,5837	0,0603	0,5585	0,5711	0,0178
60	0,0419	0,4060	0,0383	0,3545	0,3803	0,0364

PENICILINA G

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,0988	1,0000	0,1032	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,0898	0,9085	0,1000	0,9690	0,9387	0,0428
10	0,0840	0,8502	0,1000	0,9690	0,9096	0,0840
20	0,0829	0,8396	0,0860	0,8333	0,8364	0,0044
30	0,0694	0,7028	0,0892	0,8643	0,7836	0,1142
60	0,0659	0,6673	0,0600	0,5814	0,6243	0,0607

CIPROFLOXACINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1236	1,0000	0,1178	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,1095	0,8862	0,0974	0,8269	0,8566	0,0419
10	0,0887	0,7178	0,0816	0,6921	0,7050	0,0181
20	0,0500	0,4043	0,0433	0,3674	0,3858	0,0261
30	0,0242	0,1956	0,0332	0,2821	0,2389	0,0612
60	0,0012	0,0098	0,0096	0,0814	0,0456	0,0506

LEVOFLOXACINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1024	1,0000	0,0961	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,0903	0,8820	0,0934	0,9722	0,9271	0,0638
10	0,0878	0,8573	0,0820	0,8535	0,8554	0,0027
20	0,0727	0,7101	0,0795	0,8280	0,7690	0,0833
30	0,0721	0,7042	0,0707	0,7360	0,7201	0,0225
60	0,0533	0,5206	0,0580	0,6034	0,5620	0,0586

Tabla 27 Valores de absorbancia y cálculo de la concentración de especies activas de cloro con la recta de calibrado correspondiente para cada antibiótico y el experimento sin antibiótico para el tratamiento de oxidación electroquímica con DSA

AMOXICILINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0	0	0	0			0	-
5	0,006	0,017	0,024	0,068			0	-
10	0,008	0,008	0,032	0,032	Por debajo del límite de detección		0	-
20	0,012	0,014	0,048	0,056			0	-
30	0,018	0,017	0,072	0,068			0	-
60	0,037	0,038	0,148	0,152			0	-

PENICILINA G

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0	0	0	0			0	-
5	0,001	0,001	0,002	0,002			0	-
10	0,005	0,003	0,01	0,006	Por debajo del límite de detección		0	-
20	0,007	0,002	0,014	0,004			0	-
30	0,004	0,007	0,008	0,014			0	-
60	0,012	0,012	0,024	0,024			0	-

CIPROFLOXACINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0	-	0	-	0,0	-	0,00	-
5	0,143	-	0,286	-	17,53	-	17,53	-
10	0,199	-	0,398	-	47,00	-	47,00	-
20	0,356	-	0,712	-	129,63	-	129,63	-
30	0,493	-	0,986	-	201,74	-	201,74	-
60	0,708	-	1,416	-	314,89	-	314,89	-

LEVOFLOXACINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,145	0,222	0,290	0,444	18,58	59,11	38,84	28,66
10	0,170	0,200	0,340	0,400	31,74	47,53	39,63	11,16
20	0,178	0,303	0,356	0,606	35,95	101,74	68,84	46,52
30	0,650	0,393	1,300	0,786	284,37	149,11	216,74	95,65
60	0,506	0,597	1,012	1,194	208,58	256,47	232,53	33,87

BLANCO

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	-	0,000	-	0,00	-	0,00	-
5	0,229	-	0,458	-	62,79	-	62,79	-
10	0,364	-	0,728	-	133,84	-	133,84	-
20	0,595	-	1,190	-	255,42	-	255,42	-
30	0,770	-	1,540	-	347,53	-	347,53	-
60	1,149	-	2,298	-	547,00	-	547,00	-

Tabla 28 Resultados de la actividad antibiótica para cada antibiótico y en cada tiempo del experimento de oxidación electroquímica con DSA

AMOXICILINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	34	41	37,50	4,95
5		36	36,00	0,00
10	35	36	35,50	0,71
20	35	37	36,00	1,41
30	34	39	36,50	3,54
60	36	37	36,50	0,71

PENICILINA G

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	30		30	0,00
5				0,00
10	34		34	0,00
20	30		30	0,00
30	30		30	0,00
60	31		31	0,00

CIPROFLOXACINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0				0,00
5	40		40	0,00
10	43		43	0,00
20	43		43	0,00
30	35		35	0,00
60	34		34	0,00

LEVOFLOXACINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	42	47	44,5	3,54
5	35	45	40	7,07
10	45	50	47,5	3,54
20	45	50	47,5	3,54
30	40	50	45	7,07
60	45	-	45	0,00

3. Resultados de la oxidación avanzada con BDD

Tabla 29 Resultados de HPLC con tratamiento de oxidación avanzada para cada antibiótico en distintos tiempos, calculándose la concentración con las rectas de calibrado correspondientes

AMOXICILINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1088	1,0000	0,1019	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,0971	0,8925	0,1000	0,9814	0,9369	0,0629
10	0,0856	0,7868	0,0873	0,8567	0,8217	0,0495
20	0,0753	0,6921	0,0704	0,6909	0,6915	0,0009
30	0,0682	0,6268	0,0671	0,6585	0,6427	0,0224
60	0,0527	0,4844	0,0523	0,5132	0,4988	0,0204

PENICILINA G

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1176	1,0000	0,1176	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,1100	0,9354	0,1100	0,9354	0,9354	0,0000
10	0,1060	0,9014	0,1060	0,9014	0,9014	0,0000
20	0,0988	0,8401	0,0988	0,8401	0,8401	0,0000
30	0,0972	0,8265	0,0956	0,8129	0,8197	0,0096
60	0,0796	0,6769	0,0792	0,6735	0,6752	0,0024

CIPROFLOXACINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1340	1,0000	0,1000	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,1020	0,7612	0,0920	0,9200	0,8406	0,1123
10	0,0950	0,7090	0,0870	0,8700	0,7895	0,1139
20	0,0619	0,4619	0,0600	0,6000	0,5310	0,0976
30	0,0530	0,3955	0,0510	0,5100	0,4528	0,0809
60	0,0180	0,1343	0,0160	0,1600	0,1472	0,0182

LEVOFLOXACINA

Tiempo	[A] mM	[]/[]0	[B] mM	[]/[]0	Prom	S
0	0,1036	1,0000	0,1030	1,0000	1,0000	0,0000
5	0,1013	0,9779	0,1022	0,9922	0,9850	0,0101
10	0,0996	0,9617	0,1006	0,9770	0,9693	0,0109
20	0,0967	0,9335	0,0981	0,9524	0,9429	0,0133
30	0,0938	0,9054	0,0957	0,9287	0,9170	0,0165
60	0,0841	0,8118	0,0885	0,8593	0,8355	0,0336

Tabla 30 Valores de absorbancia y cálculo de la concentración de especies activas de cloro con la recta de calibrado correspondiente para cada antibiótico y el experimento sin antibiótico en el tratamiento de oxidación avanzada

AMOXICILINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	0,000	0,000	0,000			0,00	-
5	0,001	0,000	0,002	0,000			0,00	-
10	0,001	0,002	-0,006	-0,004	Por debajo del límite de detección		0,00	-
20	0,005	0,005	-0,006	-0,006			0,00	-
30	0,008	0,008	-0,010	-0,010			0,00	-
60	0,015	0,015	-0,008	-0,008			0,00	-

PENICILINA G

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	-
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	-
10	0,000	0,002	0,000	0,004	0,00	0,00	0,00	-
20	0,003	0,005	0,006	0,010	0,00	0,36	0,18	0,25
30	0,005	0,006	0,010	0,012	0,36	0,54	0,45	0,13
60	0,009	0,009	0,018	0,018	1,08	1,08	1,08	0,00

CIPROFLOXACINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	-	0,000	-	-	-	0,00	-
5	0,000	-	0,000	-	-	-	0,00	-
10	0,001	-	0,002	-	-	-	0,00	-
20	0,004	-	0,008	-	0,18	-	0,18	-
30	0,005	-	0,010	-	0,36	-	0,36	-
60	0,009	-	0,018	-	1,08	-	1,08	-

LEVOFLOXACINA

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	0,000	0,000	0,000			0,00	-
5	0,002	0,005	0,004	0,001			0,00	-
10	0,004	0,008	-0,012	-0,004	Por debajo del límite de detección		0,00	-
20	0,013	0,009	-0,024	-0,032			0,00	-
30	0,024	0,010	-0,020	-0,048			0,00	-
60	0,010	0,014	-0,050	-0,042			0,00	-

BLANCO

Tiempo	ABS A	ABS B	ABS A Real	ABS B Real	[A] ppm	[B] ppm	Prom	S
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	-
5	0,005	0,000	0,010	0,000	0,36	0,00	0,36	-
10	0,006	0,001	0,012	0,002	0,54	0,00	0,54	-
20	-	0,003	-	0,006	-	0,00	0,00	-
30	-	0,007	-	0,014	-	0,72	0,72	-
60	-	0,008	-	0,016	-	0,90	0,90	-

Tabla 31 Resultados de la actividad antibiótica para cada antibiótico y en cada tiempo del experimento de oxidación avanzada

AMOXICILINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	40	42	41,0	1,41
5	37		37,0	0,00
10	40	35	37,5	3,54
20	36	36	36,0	0,00
30	35	33	34,0	1,41
60	35		35,0	0,00

PENICILINA G

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	No hay halos en ningún tiempo			
5				
10				
20				
30				
60				

CIPROFLOXACINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0	45		45	0,00
5	46		46	0,00
10	40		40	0,00
20	35		35	0,00
30	37		37	0,00
60	40		40	0,00

LEVOFLOXACINA

Tiempo (min)	Halo A (mm)	Halo B (mm)	Prom	S
0		50	50	0,00
5	47	48	47,5	0,71
10	48	47	47,5	0,71
20	50	50	50	0,00
30	45	50	47,5	3,54
60	49	47	48	1,41